

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

Untersuchungen zur Aktivität der mitochondrialen
Permeabilitätstransitions-pore in der Cyclophilin-D-Knock-out-Maus
(Ppif^{-/-})

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Mirjam Ziemer
aus Ilmenau
Magdeburg, 2015

Dokumentationsblatt

Ziemer, Mirjam:

Untersuchungen zur Aktivität der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore in der Cyclophilin-D-Knock-out-Maus (Ppif^{-/-}), 2015, 66 Seiten, 11 Abbildungen, 146 Literaturangaben

Kurzreferat

Die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (PTP) befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und spielt eine wesentliche Rolle im Mechanismus des apoptotischen Zelltodes. Die Öffnung dieser Pore bewirkt die Freisetzung pro-apoptotischer Signalmoleküle aus dem Intermembranspalt. Das Protein Cyclophilin D (CypD) ist mit der Pore assoziiert und ist Targetprotein für den PTP-Inhibitor Cyclosporin A (CsA). Diese Arbeit untersucht mit vergleichenden Experimenten an Wildtyp- und CypD-Knock-out-Mäusen die Aktivität der PTP, die Bedeutung der regulierenden Komponente CypD und die Wirksamkeit von CsA an beiden Maustypen. Messungen des mitochondrialen O₂-Verbrauchs zeigten bei der Ko-Maus eine Verschiebung der Ca²⁺-Abhängigkeit der PTP zu höheren Konzentrationen. Eine deutliche Blockade der PTP durch CsA konnte ich respirometrisch nur beim WT darstellen. Eine Wirksamkeit von CsA an der CypD-Ko-Maus ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Mithilfe der Patch-clamp-Technik gelang uns durch Verwendung verschiedener CsA-Konzentrationen eine Charakterisierung des CsA-Effektes auf die Offenwahrscheinlichkeit der Pore sowohl beim WT, als auch bei der Ko-Maus. Die mithilfe der Michaelis-Menten-Kinetik erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten bei der Ko-Maus im Vergleich zum WT eine Verschiebung der normierten Offenwahrscheinlichkeit der Pore um 1,5 Größenordnungen zu höheren Konzentrationen.

Schlüsselwörter

Mitochondrien, Apoptose, permeability transition pore (PTP), Patch-clamp-Technik, Sauerstoffverbrauchsmessungen Cyclosporin A, Cyclophilin-D-Knock-out-Maus

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Apoptose - der programmierte Zelltod	1
1.2 Mitochondrien und Apoptose	4
1.3 Atmungskontrolle der Mitochondrien.....	5
1.4 Die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (PTP)	6
1.5 Cyclophilin D (CypD).....	9
1.6 Cyclosporin A (CsA).....	11
1.7 Fragestellung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Die Cyclophilin-D-Knock-out-Maus (Ko).....	14
2.2 Präparation von Leberzellmitochondrien der Maus	14
2.3 Sauerstoffverbrauchsmessungen am Oxygraphen	15
2.3.1 Versuchsaufbau.....	15
2.3.2 Eichung der Sauerstoffelektrode	16
2.3.3 Versuchsablauf.....	17
2.4 Patch-clamp-Experimente	17
2.4.1 Versuchsaufbau.....	17
2.4.2 Herstellung der Glaspipetten	19
2.4.3 Vorbehandlung der Elektroden	20
2.4.4 Einzelkanalableitungen an der inneren Mitochondrienmembran	20
2.4.5 Auswertung.....	21
3. Ergebnisse	24
3.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen	24
3.1.1 Keine signifikanten Unterschiede in der State-3-Atmung bei Wildtyp- (WT) und Ko-Maus	24

3.1.2 Verschiebung der Ca ²⁺ -Abhängigkeit der PTP bei der Ko-Maus zu höheren Konzentrationen	26
3.1.3 Deutliche Blockade der PTP durch CsA beim WT	29
3.2 Patch-clamp-Experimente	32
3.2.1 Einzelkanalableitungen eines großen Ionenkanals in der inneren Mitochondrienmembran	32
3.2.2 Blockade der PTP durch CsA bei der Wildtyp-Maus effektiver als bei der Ko-Maus	32
3.2.3 Charakterisierung des Effektes von CsA auf die Offenwahrscheinlichkeit der Pore anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve	36
4. Diskussion	38
4.1 Methodenkritik.....	38
4.2 Effekte von CsA auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch bei Wildtyp- und Knock-out-Maus	39
4.3 Einzelkanalableitungen von der PTP	43
4.3.1 Einzelkanalableitung der PTP	43
4.3.2 CsA-Effekt auf WT- und Ko-Maus, Charakterisierung anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve	44
5. Zusammenfassung	49
6. Abbildungsverzeichnis	50
7. Literaturverzeichnis.....	51
8. Danksagung	64
9. Ehrenerklärung	65
10. Bildungsweg	66

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi$	Transmembranpotenzial
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	apoptosis inducing factor
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	F ₀ -F ₁ -ATP-Synthase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
Bz-423	Benzodiazepin 423
CsA	Cyclosporin A
CypD	Cyclophilin D
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI
DISC	death inducing signaling complex
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ETC	electron transport chain
FADD	Fas- associated death domain protein
Fas	Fas-Rezeptor
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKII	Hexokinase II
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IMM	inner mitochondrial membrane
IMS	Intermembranspalt
Ko	Knock-out
MCU	mitochondrial calcium uniporter
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NGF	nerve growth factor
OMM	outer mitochondrial membrane
OSCP	oligomycin sensitivity conferring protein
PBR	peripherer Benzodiazepin Rezeptor
P _i C	Phosphat-Carrier
PPI	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerasen
Ppif	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase-F-Gen
PTP	permeability transition pore
ROS	reactive oxygen species
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
SOD	Superoxiddismutase
tBid	truncated Bid
TNF	Tumornekrosefaktor
VDAC	voltage dependent anion channel
WT	Wildtyp-Maus

1. Einleitung

1.1 Die Apoptose - der programmierte Zelltod

Die Bezeichnung Apoptose stammt vom altgriechischen Wort ἀποπίπτειν „apopíptein“ und beschreibt das Herabfallen der Blätter eines Baumes in Herbst. Sie benennt den programmierten Zelltod. Eine erste Definition der Apoptose als physiologische Form des Zelltodes während der Ontogenese erfolgte durch Vogt (1842). Die Erkenntnisse von Kerr et al. (1972) über die weitreichende Bedeutung der Apoptose im Organismus machten den programmierten Zelltod zum Fokus langjähriger, bis heute andauernder wissenschaftlicher Forschung. Die Apoptose ist ein genetisch determinierter (Horvitz et al. 1994), aktiver Prozess und ermöglicht im Rahmen des natürlichen Zellzyklus das Zugrundegehen einzelner Zellen ohne Schädigung des umliegenden Gewebes. Der damit erfolgende Abbau überflüssiger Zellen ist unerlässlich für die beständige Differenzierung des mehrzelligen Organismus, die Entwicklung der Immuntoleranz und die Homöostase der Zellzahl.

Eine apoptotische Zelle zeigt typische morphologische Veränderungen und molekulare Ereignisse. Es erfolgt eine Umgestaltung des Zytoskelettes, das Chromatin kondensiert, die DNA wird fragmentiert und die Kernmembran kollabiert (Zimmermann et al. 2001). An der Zellmembran der schrumpfenden Zelle bilden sich Vesikelabschnürungen, die anschließend zu Apoptosekörpern (apoptotic bodies) fragmentieren (Kerr et al. 1972). Durch die anschließende Phagozytose wird die Freisetzung zellulärer Bestandteile verhindert (Fadok et al. 1998). Die Membran bleibt dabei intakt, Entzündungsmediatoren wie K^+ , H^+ oder ATP können nicht freigesetzt werden.

Neben der Apoptose ist die Nekrose als zweite wichtige Form des Zelltodes zu nennen. Bei der Nekrose erfolgt ein Absterben der Zelle als Reaktion auf eine von extern einwirkende irreversible Schädigung, wie stumpfes Trauma, Toxine, Hypoxämie und Detergenzien (Blatt und Glick 2001). Im Gegensatz zur Apoptose kommt es hierbei zur Zellschwellung und Membranruptur mit Freisetzung zellulärer Bestandteile und einer typischen Entzündungsreaktion mit Invasion von Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen (Savill 1997).

1. Einleitung

Man unterscheidet die Induktion der Apoptose durch intrinsische und extrinsische Signale (**Abb.1**).

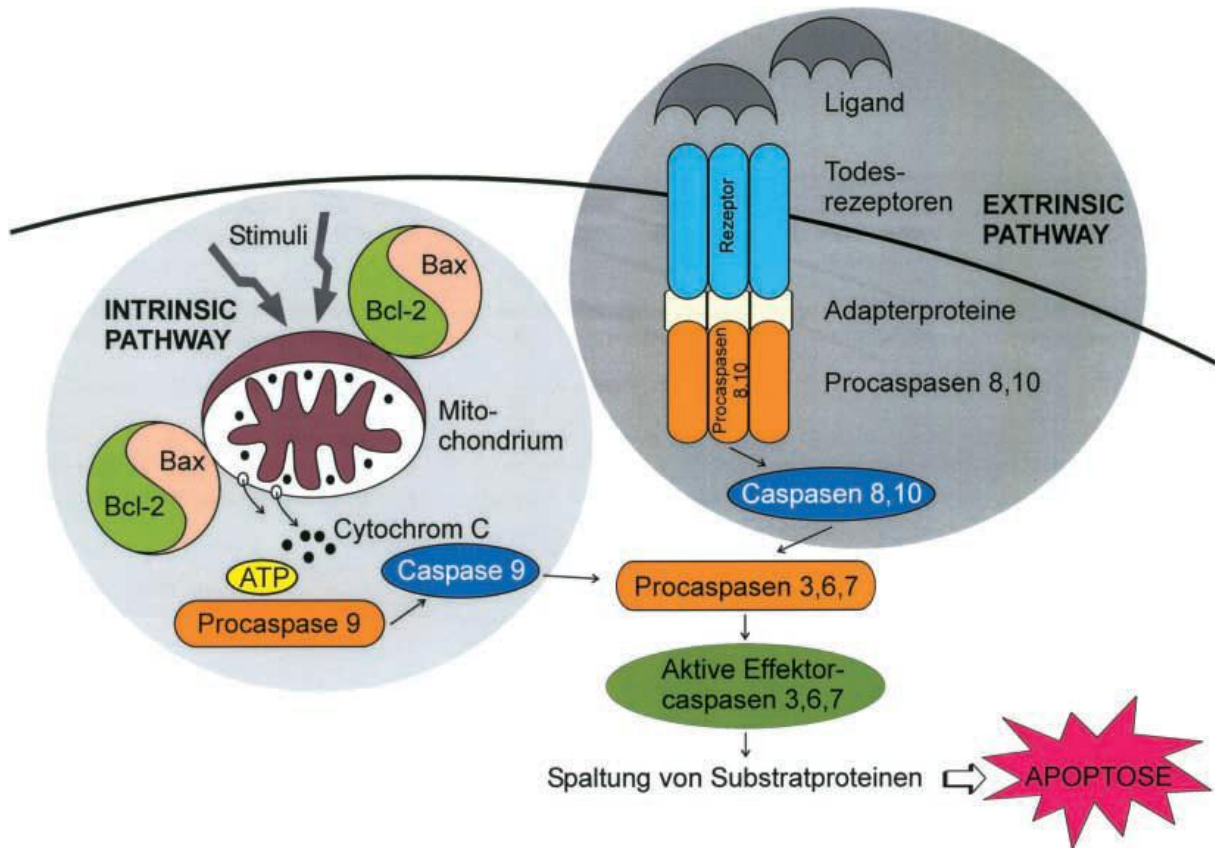


Abbildung 1

Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose. Beim extrinsischen Signalweg (dunkle Schattierung) kommt es über die Aktivierung membrangebundener Todesrezeptoren (z. B. Fas), die zur TNF/NGF-Rezeptorfamilie gehören, zur Apoptose. Die Initiator-Procaspasen 8 und 10 werden über Adapterproteine an den Komplex gebunden und aktiviert (=death inducing signaling complex, DISC). Bei der intrinsischen Apoptosekaskade (helle Schattierung) kommt es unter bestimmten Stimuli zur Freisetzung mitochondrialer Apoptosemediatoren (u. a. Cytochrom c) aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma. Die Permeabilität der Mitochondrienmembran wird durch ein Gleichgewicht aus konkurrierenden pro- (z. B. Bax) und anti-apoptotisch (z. B. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)) wirksamen Bcl-Proteinen moduliert. ATP-abhängig und mithilfe von Cytochrom c wird die Procaspase 9 aktiviert. Gemeinsame Endstrecke beider Signalwege bildet die Aktivierung der Effektor-Procaspasen 3, 6 und 7 sowie letztendlich die DNA-Fragmentierung.

Aus: (Padosch et al. 2001)

Intrazelluläre Signale wie oxidativer Stress, DNA-Schäden oder Enzymdefekte sind Induktoren der Apoptose über den intrinsischen Weg. Der intrinsische Weg ist mitochondrienabhängig. Beim extrinsischen Signalweg kommt es über die Aktivierung membrangebundener Rezeptoren, wie dem Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor oder Fas-Liganden, zur Apoptose. Nach Bindung des Liganden trimerisieren die Todesrezeptoren und binden mit ihrer zytosolischen Domäne Adaptermoleküle wie FADD (Fas-associated death domain protein). Dieser Proteinkomplex wird auch DISC (death inducing signaling complex) genannt und ist das Verbindungselement zwischen aktiviertem Todesrezeptor und den intrazellulär vorhandenen Procaspasen, den Hauptmediatoren der Apoptose.

Caspasen sind Cystein-abhängige, Aspartat-spezifische Proteasen und werden entsprechend ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt (Muzio 1998). Gruppe 1 hat Einfluss auf zytokinprozessierende Aktivitäten. Gruppe 2 und 3 sind relevant für die Apoptose und beinhalten die Initiator- und Effektor-Caspasen. Die Initiator-Caspasen 2, 8, 9 und 10 stehen am Anfang der Signalkaskade und sind an der Induktion der Apoptose beteiligt. Die aktivierten Effektor-Caspasen 3, 6, und 7 katalysieren die exakt abgestimmte proteolytische Spaltung ihrer Substrate und führen so zur Eliminierung der Zelle. Entscheidender Schritt in der Signalkaskade ist die autokatalytische Spaltung und damit Aktivierung der am FADD gebundenen Procaspase 8. Die Caspase 8 aktiviert nicht nur die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, sondern spaltet ebenfalls das pro-apoptotische Bcl-2-Protein Bid zu tBid (truncated Bid) und leitet damit den intrinsischen Signalweg ein, der zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium führt (Li et al. 1998; Luo et al. 1998; Degli Esposti 2002). Als Schlüsselmolekül bei allen Apoptoseformen gilt die Effektor-Caspase 3 (Hengartner 2000). Sie steht am Beginn der gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Signalweges und wird von den Initiator-Caspasen 8 und 9 aktiviert. Der komplexe Prozess der Apoptose ist durch eine Balance aus konkurrierenden pro- und anti-apoptotisch wirksamen Modulatorproteinen feinreguliert. Eine Störung dieses Gleichgewichtes kann einerseits zu gesteigerter Apoptose, z. B. bei Transplantatabstoßung oder Neurodegeneration, führen und andererseits bei Autoimmunkrankheiten oder bestimmten Tumoren pathologisch verminderte Apoptose nach sich ziehen.

1.2 Mitochondrien und Apoptose

Mitochondrien sind lebensnotwendige metabolische Energiequellen. Als Orte der oxidativen Phosphorylierung, der β -Oxidation und des Zitratzyklus sorgen sie für die beständige Energiebereitstellung in Form von ATP. Außerdem spielen die Mitochondrien eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle apoptotischer Abläufe. Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Permeabilitätssteigerung der inneren Mitochondrienmembran (Lemasters et al. 1998). Der folgende Zusammenbruch des Membranpotenzials ($\Delta\Psi$) ermöglicht den konsekutiven Austritt mitochondrialer Apoptose-Mediatoren ins Zytoplasma (Ly et al. 2003).

Bei der mitochondrialen Regulation der Apoptose sind die Proteine der Bcl-2-Familie von besonderer Bedeutung. Das Auftreten von bis zu vier Domänen (BH 1-4) hoher Sequenzhomologie (Bcl-2 homology) ist charakteristisch für alle Mitglieder dieser Genfamilie. Namensgebend ist das Protoonkogen Bcl-2, das in folliculären B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird. Nach Struktur und Funktion erfolgt eine Einteilung in verschiedene Gruppen, wie zum Beispiel in pro-apoptotische (Bid, Bax, Bak, Bok, Bik, Bnip3, Bad, Bim, Bmf, Noxa, Puma) und anti-apoptotische Mitglieder (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, Boo, Bcl-B) (Gross et al. 1999; Adams und Cory 2001; Puthalakath und Strasser 2002). Bcl-2 ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran, besitzt aber eine Transmembrandomäne, die ein Eindringen in die äußere Mitochondrienmembran ermöglicht (Hockenbery et al. 1990). Diese Domäne ist für die anti-apoptotische Wirkung unerlässlich. In stressfreiem Milieu sorgt eine Balance zwischen anti-apoptotischem Bcl-2 und den pro-apoptotischen Proteinen Bax, Bak oder Bid für eine dauerhafte Integrität der Mitochondrien. Stress-Signale stören diese Balance. Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Aktivierung von Bid durch die Caspase 8 oder zur verstärkten Expression von Bax. Die schützende anti-apoptotische Kapazität von Bcl-2 ist dann überschritten. Die stimulierenden Mitglieder der Bcl-2-Familie verursachen Alterationen in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch der Austritt von Apoptose-Mediatorproteinen, u. a. Cytochrom c, AIF (apoptosis inducing factor), Smac/DIABLO aus dem Intermembranspalt (IMS) ermöglicht wird (Narita et al. 1998; van Loo et al. 2002). Der genaue Mechanismus der mitochondrialen Apoptose ist nicht vollständig aufgeklärt.

Für die Freisetzung von Cytochrom c werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert. Ein Modell nach Zamzami und Kroemer (2001) beschreibt die Cytochrom c-Freisetzung als Ergebnis der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-transitions-pore (PTP). Nachdem gezeigt wurde, dass die PTP in der inneren Membran sitzt, bleibt die Frage offen, wie sie mit der äußeren Membran kommuniziert. Das andere Modell vermutet eine Mg^{2+} -sensitive Oligomerisierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak zu tetrameren Kanälen, durch die die Apoptosemediatoren aus dem IMS freigesetzt werden (Eskes et al. 1998). Cytochrom c, der wichtigste dieser Mediatoren, bindet in Gegenwart von desoxy-ATP an den monomeren Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1). Diese Bindung führt über eine Konformationsänderung zu einem Apaf-1-Heptamer, dem Apoptosom. Dieses bewirkt die Aktivierung der Initiator-Procaspase 9, welche analog zur Signalkaskade des extrinsischen Weges die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert (Li et al. 1997; Green und Amarante-Mendes 1998). Die weiteren pro-apoptotischen Substrate aus dem IMS sind Smac/DIABLO, welches die Aktivität endogener Caspaseinhibitoren herabsetzt sowie AIF, dessen Freisetzung im Nucleus zur Kondensation des Chromatins und Fragmentierung der DNA führt (Adrain et al. 2001; Candé et al. 2002; Verhagen et al. 2000).

1.3 Atmungskontrolle der Mitochondrien

Die respiratorische Aktivität von Mitochondrien unterliegt verschiedenen Einflüssen. Elektronentransport und Phosphorylierung sind physiologisch eng miteinander gekoppelt. Es kommt nur zur Oxidation von Substrat und zum Sauerstoffverbrauch, wenn ADP und organisches Phosphat (P_i) hinreichend vorhanden sind und zu ATP umgewandelt werden können. Das Fehlen von zeitgleicher ATP-Bildung über die F_0F_1 -ATP-Synthase unterbindet den Sauerstoffverbrauch. Für die Atmungskontrolle isolierter Mitochondrien, welche durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, wurden fünf Zustände mit entsprechend unterschiedlichen Atmungsgeschwindigkeiten definiert (Chance und Williams 1956). Im State 1 der mitochondrialen Atmung ist Sauerstoff im Überfluss vorhanden, ADP und Substrat lediglich in limitiertem Maße. Da nur endogene Substrate veratmet werden, nimmt der Sauerstoffgehalt nur sehr langsam ab. Gibt man Substrate wie Glutamat und

Malat hinzu, erfolgt ein Wechsel von der State-1- in die State-2-Atmung mit leichtem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs. Ist neben den Atmungskettensubstraten auch ADP im Überfluss vorhanden, befinden sich die Mitochondrien im State 3. Dieser Zustand unter Anwesenheit aller benötigten Substrate entspricht der maximalen Atmungsaktivität und wird auch als unkontrollierte Atmung bezeichnet. State 4 wird erreicht, wenn es nach vollständiger Phosphorylierung von vorhandenem ADP zu ATP zur Erschöpfung des ADP-Vorrates kommt und kein weiteres ADP ins Mitochondrium transportiert wird. Diese sogenannte kontrollierte Atmung mit im Vergleich zu State 3 deutlich geringerem Sauerstoffverbrauch entspricht dem Ruhezustand der Mitochondrien und hängt als nicht-phosphorylierende Atmung von der Intaktheit der inneren Mitochondrienmembran ab. Ist die PTP geöffnet oder kommt es aus anderen Gründen zu einer Entkopplung der Atmungskette, ist die State-4-Atmung erhöht. Die bei Sauerstoffmangel auftretende verringerte Respiration wird auch als State-5-Atmung bezeichnet.

1.4 Die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (PTP)

Die Bedeutung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (permeability transition pore, PTP) ist in den vergangenen Jahrzehnten kontrovers diskutiert worden. Diese Pore bisher noch weitgehend unbekannter molekularer Struktur befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und spielt eine wesentliche Rolle bei den Vorgängen der Apoptose. Die mitochondriale Beteiligung an der Apoptose zeigt sich in einem frühen Abfall des mitochondrialen Transmembranpotenzials ($\Delta\Psi$) (Zamzami et al. 1995). Bei isolierten Mitochondrien kann die Akkumulation von Ca^{2+} zu einem nahezu kompletten Verlust des mitochondrialen $\Delta\Psi$ führen (Raaflaub 1953). Hunter et al. (1976) zeigten, dass die Ca^{2+} -Zugabe zu einer Permeabilitäts-erhöhung der inneren Mitochondrienmembran (permeability transition) und konsekutivem Anschwellen der Mitochondrien führte.

Anfang der 1990er Jahre bestätigten Patch-clamp-Experimente an Mitoplasten die Vermutung, dass ein Ionenkanal für die Permeabilitätsänderung verantwortlich ist (Szabó und Zoratti 1992, 1991). Der Kanal wurde „permeability transition pore“ genannt und für ihn eine Leitfähigkeit von bis zu 1,3 nS und ein Porendurchmesser von etwa 3 nm für die Passage von Molekülen bis zu einer Größe von 1,5 kD

beschrieben. Zum Teil noch vor der eigentlichen Entdeckung des Ionenkanals PTP hatte man eine Beeinflussung der mitochondrialen Schwellung durch verschiedene Faktoren erkannt. So wird die PTP durch hohe Matrixkonzentrationen von Ca^{2+} , P_i , Thyroxin, Depolarisation des $\Delta\Psi$, reaktive Sauerstoffspezies und Fettsäuren stimuliert, sowie durch Mg^{2+} und Adeninnukleotide gehemmt (Wieckowski und Wojtczak 1998; Brenner-Holzach und Raaflaub 1954; Hunter und Ford 1955; Lehninger 1959; Lehninger et al. 1959; Azzi und Azzone 1965; Chappell und Crofts 1965; Crompton 1999; Kroemer et al. 1997). Potente Inhibitoren der Pore sind außerdem Bongkreksäure und Cyclosporin A (Connern und Halestrap 1992; Basso et al. 2005).

Die tatsächliche Struktur der PTP ist bis heute unklar. Eine frühe Hypothese vermutete einen Multiproteinkomplex aus Adenin Nukleotid Translokator (ANT) (Haworth und Hunter 2000; Lê Quôc und Lê Quôc 1988), voltage dependent anion channel (VDAC) (Crompton et al. 1998; Shimizu et al. 2001), Cyclophilin D (CypD), F_0F_1 -ATP-Synthase (Hunter et al. 1976; Giorgio et al. 2009; Bonora et al. 2013) und assoziierten Proteinen wie Hexokinase, Kreatinkinase und dem peripheren Benzodiazepin Rezeptor (PBR) (Anholt et al. 1986; McEnery et al. 1992).

Die tatsächliche Rolle der genannten Bestandteile für die Funktion der PTP wurde an verschiedenen Knock-out (Ko)-Mäusen untersucht. Mitochondrien ohne ANT waren zur Bildung der PTP fähig, allerdings erst unter höheren Ca^{2+} -Konzentrationen (Kokoszka et al. 2004). Daraus folgte die Vermutung, dass ANT keine essentielle Komponente der PTP sein könne. Baines et al. (2007) stellten unter Knock-out aller drei VDAC-Gene eine PTP-Formation und einen unveränderten Ablauf des nekrotischen und apoptotischen Zelltodes fest. Nakagawa et al. (2005) und Tsujimoto et al. (2006) publizierten, dass die CypD-Knock-out-Maus keine Ca^{2+} -Aktivierung einer Cyclosporin A (CsA)-sensitiven PTP aufwies und schlussfolgerten daraus eine essentielle Rolle des CypD bei der permeability transition. Basso et al. (2005) stellten eine verglichen zum Wildtyp durch zweifach höhere Ca^{2+} -Konzentration stimulierbare PTP bei der Ko-Maus ohne CypD fest. CsA-Sensibilität wiesen die Ko-Mäuse nicht auf. CypD scheint also eine regulierende Funktion einzunehmen und ebenfalls nicht essentieller Bestandteil der Pore zu sein. Giorgio et al. (2009) zeigten, dass CypD direkt an den lateralen Stab der ATP-Synthase bindet und deren Aktivität beeinflusst. Bonora et al (2013) stellten an der Ko-Maus die Notwendigkeit der $\text{F}_0\text{-c-}$

Untereinheit der ATP-Synthase für die Funktion der PTP fest. Es folgten Experimente, in denen sich zeigte, dass die PTP aus Dimeren der F_0F_1 -ATP-Synthase gebildet wird (Giorgio et al. 2013).

Der PBR ist mit VDAC und ANT assoziiert, benötigt sie aber nicht für seine Rezeptorfunktion (Anholt et al. 1986; McEnery et al. 1992). Patch-clamp-Experimente an Mitoplasten aus Rattenherzen ließen eine Inhibition der PTP durch PBR-Liganden erkennen (Kinnally et al. 1993). Andere Autoren beschrieben im Gegensatz dazu eine Aktivierung der Pore durch PBR-Liganden (zur Übersicht: Bernardi et al. 2006). Aufgrund dieser widersprüchlichen Literaturlage ist eine eindeutige Aussage zur Beteiligung des PBR an der PTP schwierig. Mit dem Wissen, dass VDAC kein essentieller Bestandteil der PTP ist, gibt der modulierende Effekt des PBR u. a. auf die Expression von VDAC keine hinreichenden Anzeichen für den PBR als festen Bestandteil der PTP.

Bei der Regulation der PTP spielen auch die Proteine der Bcl-2-Familie eine große Rolle. Bcl-2 als anti-apoptotisches Protein kann die PTP-vermittelte Depolarisation verhindern (Kroemer 1997). Den pro-apoptotischen Faktoren Bax und Bak wurde eine direkte Interaktion mit VDAC und ANT nachgesagt (Shimizu et al. 1999; Narita et al. 1998; Marzo et al. 1998; Brenner et al. 2000). Bax kann einen Zusammenbruch des mitochondrialen $\Delta\Psi$ mit nachfolgender Cytochrom c-Ausschüttung induzieren, was durch CsA verhindert werden kann. Whelan et al. (2012) beschreiben eine essentielle Beteiligung von Bax und Bak bei der mitochondrialen Nekrose. Beide Proteine scheinen also weit gefasste Regulationsaufgaben in beiden Formen des Zelltodes zu haben. Die PTP ist Ziel der Regulation durch die Bcl-2-Familie und unter anderem für die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine wie Cytochrom c verantwortlich.

1.5 Cyclophilin D (CypD)

Cyclophilin D (CypD) ist ein Protein der mitochondrialen Matrix und wird durch das Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase-F-Gen kodiert (Ppif). Cyclophiline finden sich in eukaryotischen und prokaryotischen Genomen und wirken als Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerasen (PPI). PPIasen katalysieren die cis-trans-Umwandlungen von Prolin-Peptid-Bindungen, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten bei der Proteinfaltung. Die meisten Cyclophiline binden das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Im menschlichen Genom sind insgesamt 16 Cyclophiline kodiert (Wang und Heitman 2005). CypD ist die einzige mitochondriale Isoform und wird nach Spaltung ins Mitochondrium importiert (Connern und Halestrap 1992; Johnson et al. 1999).

Tanveer et al. (1996) identifizierten CypD als die PPIase, welche die Öffnung der PTP kontrolliert. Sie ist mitochondrialer Rezeptor für den PTP-Inhibitor CsA und wirkt modulierend auf die PTP, ohne eine strukturelle Komponente der Pore zu sein (Baines et al. 2005; Basso et al. 2005; Nakagawa et al. 2005; Schinzel et al. 2005). Es hat sich gezeigt, dass viele Komponenten der PTP zwar nicht essentiell sind, aber eine Rolle bei der Modulation der Pore spielen.

Abb. 2 (aus Elrod und Molkentin 2013) stellt CypD-Interakteure dar und ist der Versuch einer Veranschaulichung der bekannten Aktivatoren, Inhibitoren und Bestandteile der PTP.

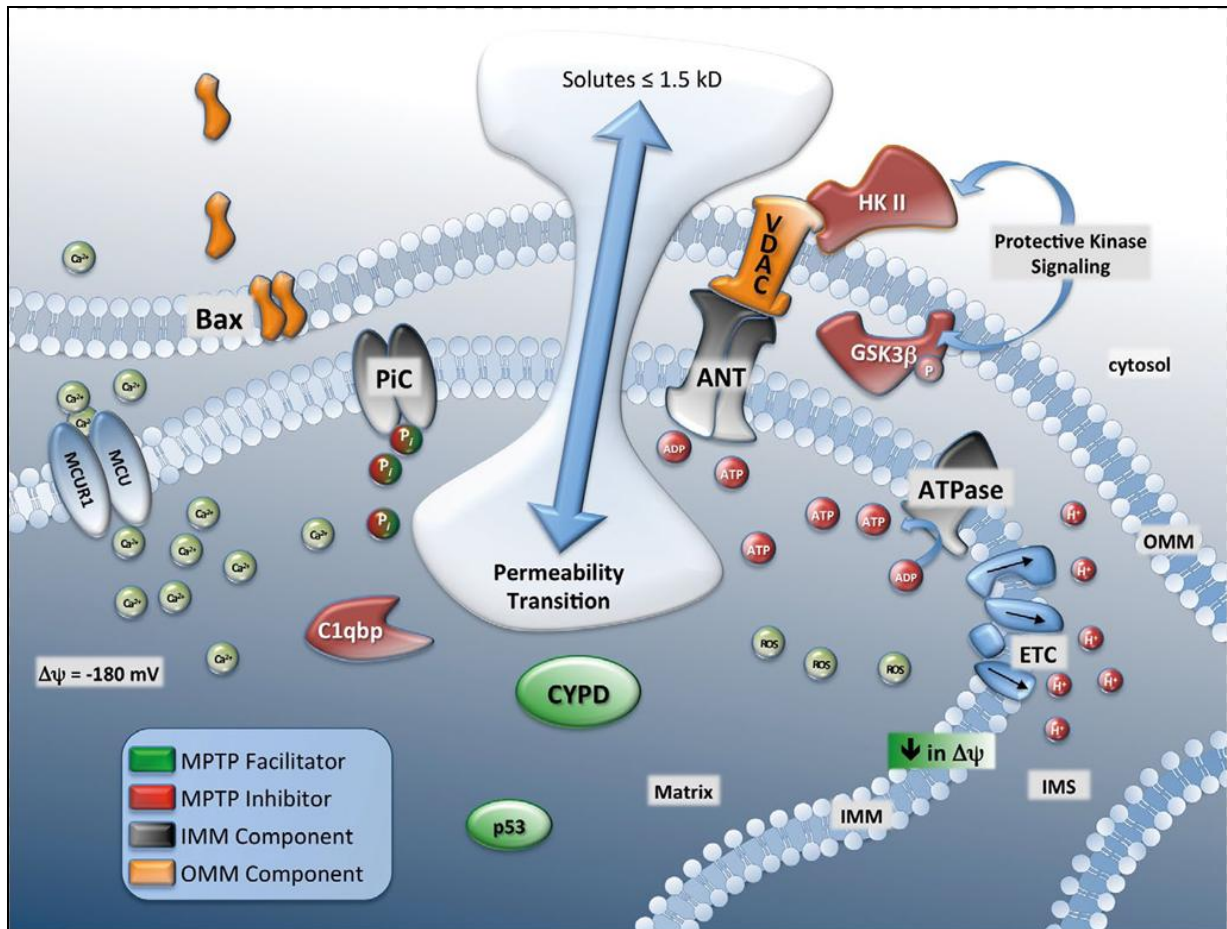


Abbildung 2

CypD Interakteure und physiologische Regulierer der PTP. Diverse molekulare Komponenten der inneren Mitochondrienmembran (IMM, grauschwarz) und der äußeren Mitochondrienmembran (OMM, orange) werden als Bestandteile der PTP diskutiert. Nach Öffnung ermöglicht die PTP die Passage von Molekülen bis zu 1,5 kDa. Die Modulation der PTP erfolgt durch PTP Aktivatoren (grün) und PTP Inhibitoren (rot). Angetrieben vom negativen Membranpotential ($\Delta\psi$) wird Ca^{2+} durch den mitochondrialen Calcium Uniporter (MCU, MCUR1) in die Matrix transportiert. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit der Pore, ADP und ATP gelten als Inhibitoren. Anorganisches Phosphat (P_i) ist ein Aktivator der PTP, eine zusätzliche Rolle als Inhibitor bei Vorliegen bestimmter Voraussetzungen wird diskutiert (Basso et al. 2008).

Weitere Abkürzungen: P_iC =Phosphate Carrier, VDAC=voltage dependent anion channel, ANT=Adenin Nukleotid Translokator, IMS=Intermembranspalt, HK II= Hexokinase II, GSK3β=Glykogen-Synthase-Kinase 3β, ATPase= $\text{F}_0\text{-F}_1$ -ATP-Synthase, ETC=electron transport chain.

Aus: (Elrod und Molckentin 2013)

1.6 Cyclosporin A (CsA)

Cyclosporin A ist ein immunsuppressives Basistherapeutikum, das in der Natur in den norwegischen Schlauchpilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* vorkommt. Es wurde 1969 vom Biologen Hans Peter Frey entdeckt (Svarstad et al. 2000). **Abb.3** zeigt die Strukturformel der Substanz. Es handelt sich um ein zyklisches Peptid bestehend aus 11 Aminosäuren mit einer molaren Masse von $1202,61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Borel 2002).

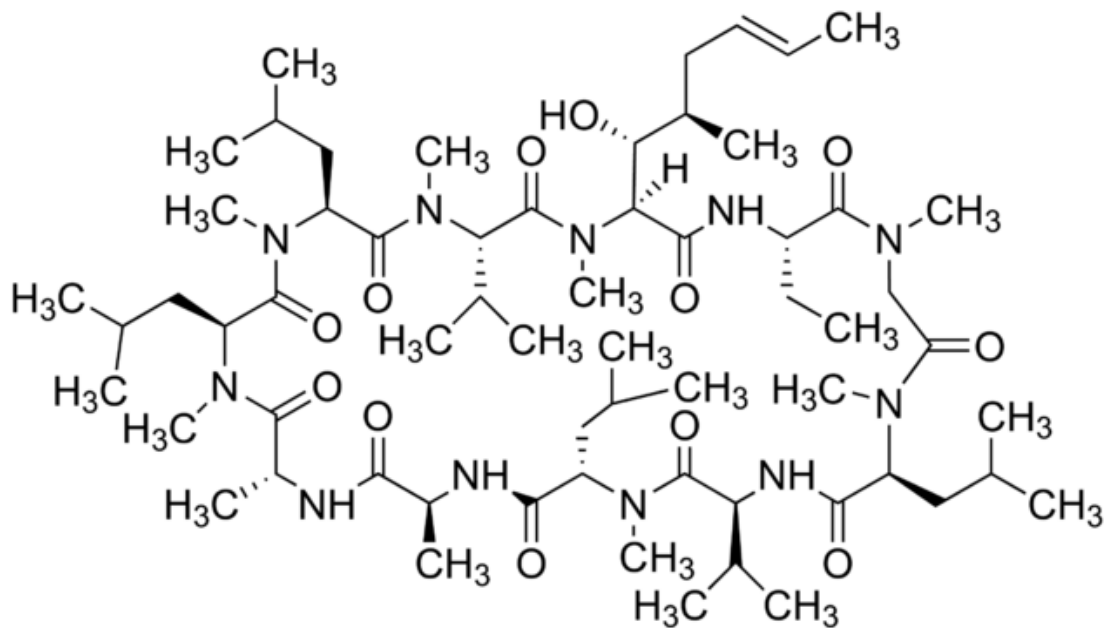


Abbildung 3

Strukturformel des CsA

In der Transplantationsmedizin hat sich der Einsatz zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen bewährt. Die immunsuppressive Wirkung beruht auf der indirekten Hemmung von Calcineurin durch Bindung an die zytosolische Prolyl-cis-trans-Isomerase Cyclophilin A (Takahashi et al. 1989; Fischer et al. 1989; Liu et al. 1991; Harding et al. 1989). Die Calcineurin-Inhibition verhindert die Ausschüttung immunstimulierender Stoffe und die Aktivierung und Vermehrung von Lymphozyten (Huai et al. 2002). Die ersten Erfolge bei der Verhinderung von Abstoßungsreaktionen zeigten sich bei Nieren- (Calne et al. 1978) und Lebertransplantationen (Starzl et al. 1981).

Erste Beobachtungen einer möglichen mitochondrialen Wirkung von CsA wurden mithilfe elektronenmikroskopischer Analysen von Nierenbiopsaten CsA-behandelter Patienten gemacht (Mihatsch et al. 1981). Weitere Untersuchungen zeigten eine Beeinflussung der mitochondrialen Atmung durch CsA mit einem inhibitorischen Einfluss auf die State-3-Atmung und vermehrter Ca^{2+} -Akkumulation in der mitochondrialen Matrix (Jung und Pergande 1985; Fournier et al. 1987). Später wurde die Inhibition der PTP durch CsA entdeckt und das die Offenwahrscheinlichkeit der Pore kontrollierende CypD als Target für CsA identifiziert (Crompton et al. 1988; Broekemeier und Pfeiffer 1989; Halestrap und Davidson 1990; Tanveer et al. 1996). Weitere Anwendungsgebiete des CsA fanden sich bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Gross 2012), von Glomerulonephritiden und von dermatologischen Erkrankungen wie schweren, therapieresistenten Formen von atopischer Dermatitis oder Psoriasis. Zusätzliche Verwendung zeigte sich in der Augenheilkunde bei schweren Entzündungszuständen der Binde- und Hornhaut (Ragam et al. 2014) oder der Keratoconjunctivitis sicca (Karn et al. 2014).

Besonders auf dem Gebiet der ischämiebedingten Krankheitsbilder sind bereits vielfältige Untersuchungen zu Wirkung und möglicher therapeutischer Verwendung von CsA durchgeführt worden. Das Pharmakon konnte ischämiebedingte Leberschädigung reduzieren, - eine Feststellung, die die Hemmung der PTP als nützlichen Ansatz in der Therapie Apoptose-assoziiierter Erkrankungen nahelegt (Hayashi et al. 1991; Kawano et al. 1989; Yamanoi et al. 1991). Zell- und kardioprotektive Eigenschaften von CsA im Rahmen des postischämischen Reperfusionsschadens bieten weitere Ansätze therapeutischer Nutzung (Hausenloy et al. 2012). Zahlreiche Experimente, vielfach an CypD-Knock-out-Mäusen, zeigten kausale Zusammenhänge zwischen dieser Zytoprotektion und CypD bzw. Hemmung der PTP durch CsA. Erfolge zeigten sich in Forschungsergebnissen bezüglich Herz (Baines et al. 2005; Nakagawa et al. 2005), Hirn (Schinzel et al. 2005; Wang et al. 2009) und Niere (Devalaraja-Narashimha et al. 2009; Park et al. 2011). Da im ischämischen Milieu reichlich die klassischen PTP-Aktivatoren Ca^{2+} und ROS vorkommen, ist die zytoprotektive Eigenschaft des CsA nicht verwunderlich.

Ebenfalls interessant sind Experimente zur Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) an Superoxiddismutase (SOD) 1-Mutationen im Mausmodell. Mäuse mit SOD1-Muta-

tionen entwickeln eine Erkrankung der Motoneurone mit deutlichen Ähnlichkeiten zu den bei ALS-Patienten beobachteten Pathologien (Gurney et al. 1994). Mitochondrien aus dem Rückenmark dieser Mäuse wiesen lange vor dem Auftreten des klassischen Erscheinungsbildes der Erkrankung mit Muskelschwäche und Atrophie eine reduzierte Calcium-Retentionskapazität auf (Damiano et al. 2006). Diese Verminderung der Ca^{2+} -Retentionskapazität konnte durch Eliminierung des $\text{Ppif}^{-/}$ -Gens verhindert werden (Parone et al. 2013). Die CypD-Ko-Mäuse wiesen drei verschiedene ALS-verursachende SOD1-Mutationen auf und zeigten im gesamten Krankheitsverlauf eine verbesserte mitochondriale ATP-Synthese, reduzierte mitochondriale Schwellung, Attenuierung der Glia-Aktivierung, Verminderung der Aggregate aus mutierten fehlgefalteten SOD1 im Rückenmark und weniger Zelluntergang von Motoneuronen. Die Gesamtüberlebensdauer blieb unbeeinflusst. Diese Erkenntnisse liefern einen Erklärungsansatz für die Ergebnisse von Kirkinezos et al. (2004) zur verbesserten Überlebenszeit im ALS-Mausmodell mit permeabler Blut-Hirn-Schranke unter systemischer CsA-Behandlung.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Die exakte molekulare Zusammensetzung der PTP ist nicht geklärt. CypD ist zwar kein struktureller Bestandteil der Pore, wirkt aber modulierend auf sie und ist das Zielprotein des Immunsuppressivums CsA. Die vielfältigen therapeutischen Einsatzbereiche von CsA machen es zu einem interessanten Pharmakon mit deutlich besserem Potential, besonders im Bereich der ischämiebedingten und Apoptose-assoziierten Krankheitsbilder. Diese Arbeit untersucht die Aktivität der PTP an Ko-Mäusen ohne die regulierende Komponente CypD und die Beeinflussung der Pore durch CsA. Die Wirksamkeit von CsA an der CypD-Ko-Maus wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Anhand der Ergebnisse von Patch-clamp-Experimenten soll die Wirkung von CsA auf die Offenwahrscheinlichkeit der PTP von WT- und Ko-Maus beschrieben und für die CsA-Wirkung an beiden eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden. Ergänzend werden Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von WT und Ko-Maus unter verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen jeweils mit und ohne CsA-Einsatz gemessen.

2. Material und Methoden

2.1 Die Cyclophilin-D-Knock-out-Maus (Ko)

Alle Versuche wurden an Leberzell- bzw. Hirnmitochondrien von Cyclophilin-D-Knock-out-Mäusen C57BL/6SV129 (Ppif^{-/-}) und den dazu gehörigen Wildtyp-Mäusen C57BL/6SV129 durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte im Alter von 2 bis 4 Monaten. Die Mäuse erhielten wir von J. Molzentin aus dem Howard Hughes Medical Institute vom Children's Hospital der University of Cincinnati in Ohio, USA, dem dafür herzlich gedankt sei. Durch genetische Manipulation wurde bei den Ko-Mäusen gezielt das für Cyclophilin D kodierende Gen Ppif ausgeschaltet, die Wildtyp-Mäuse mit unverändertem Genotyp wurden für die Kontrollversuche verwendet. Die Behandlung und Präparation der Tiere erfolgte nach den gesetzlichen Tierschutzbestimmungen.

2.2 Präparation von Leberzellmitochondrien der Maus

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation oder zervikale Dislokation. Durch einen Bauchschnitt wurde anschließend die Leber entnommen und sofort zweimal in eiskaltem Medium B (250 mM Saccharose, 10 mM HEPES, pH 7,2 mit KOH) gewaschen und nach Entfernung nicht-hepatischer Gewebereste mit einer Schere grob zerkleinert. Anschließend erfolgte nach Aufnahme des Gewebes in ca. 20 ml des Mediums A (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA; 10 mM HEPES, pH 7,2 mit KOH) eine Homogenisation im Potter-Homogenisator mit 6-8 Hüben zur Zerstörung der Zellmembran der Hepatozyten. Das erhaltene Homogenisat wurde dann 5 min bei 800 g zentrifugiert. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde verworfen und der flüssige Überstand in einem neuen Zentrifugenröhrchen 4 min bei 5100 g zentrifugiert. Das hierbei entstandene Pellet wurde in 1 ml des Mediums B aufgenommen, homogenisiert und 2 min bei 12300 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet wiederum in 1 ml des Mediums B aufgenommen, mit der Pipette resuspendiert und 10 min bei 12300 g zentrifugiert. Das zuletzt entstandene Pellet wurde in 0,5-1,0 ml des Mediums C (250 mM Saccharose, 0,5 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7,2 mit KOH) aufgenommen, nochmals mit der Pipette resuspendiert und bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert.

Bei der Präparation der Leberzellmitochondrien für die Patch-clamp-Experimente wurden 4 Zentrifugationsschritte von jeweils 8 min Dauer durchgeführt. Das Lebergewebe wurde in Präparationslösung gegeben (250 mM Sucrose, 5 mM HEPES; pH 7,2 mit KOH). Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 9200 g zur Abtrennung der Proteasen. Das erhaltene Pellet wurde erneut in 10 ml Präparationslösung aufgenommen und bei 800 g zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand mit 9200 g zentrifugiert. Erst im letzten Durchgang wurde das Pellet in Aufbewahrungslösung aufgenommen (storage solution: 150 mM KCl, 10 mM HEPES; pH 7,2 mit KOH) und letztmalig für 8 Minuten bei 9200 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Aufbewahrungsmedium aufgenommen. Zeitweise war bei eben genanntem Präparationsschema für die Patch-clamp-Experimente die Mitochondriendichte gering. Daher wurden einige Präparationen nach dem anfangs erläuterten Schema für die Atmungsmessungen durchgeführt. Sie brachten aber keine entscheidenden Vorteile.

In einem weiteren Ansatz wurde statt Präparations- und Aufbewahrungslösung während der Präparation ausschließlich isotone Lösung (150 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM EGTA; pH-Wert Einstellung auf 7,2 mit KOH) verwendet. Diese Präparationen erbrachten vergleichsweise viele Mitochondrien. In jedem Fall wurde sorgfältig darauf geachtet, dass bei den Patch-clamp-Experimenten für die Medien kein Serumalbumin verwendet wurde, weil dieses die Oberflächenladung am Pipetten-Glas absättigt und damit engen Glas-Membran-Kontakt im Experiment verhindert. Die Leberzellmitochondrien wurden nach jeder Präparation auf Eis gelagert und konnten so ca. 8-10 Stunden für Sauerstoffverbrauchsmessungen am Oxygraphen und ca. 30 Stunden für Patch-clamp-Experimente verwendet werden.

Die Proteingehalte der Mitochondriensuspensionen wurden nach der Biuret-Methode ermittelt.

2.3 Sauerstoffverbrauchsmessungen am Oxygraphen

2.3.1 Versuchsaufbau

Für die hochauflösenden Atmungsmessungen wurde ein Oxygraph der Firma Oroboros (Innsbruck, Österreich) verwendet. Dieses Zwei-Kammer-Titrations-

Injektionsrespirometer enthielt in jeder luftdicht verschließbaren Kammer eine Platin-Silber-Elektrode (Clark-Elektrode), mit der der Sauerstoffgehalt der Lösung gemessen wurde. Diese Elektrode, bestehend aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, wurde durch eine definierte Polarisationsspannung versorgt und war von einer Elektrolytlösung umgeben. Durch die sie ummantelnde dünne, gasdurchlässige Teflonmembran diffundierte der in der Probe enthaltene Sauerstoff und wurde dann an der Kathode vollständig reduziert. Zur quantitativen Erfassung des Sauerstoffverbrauchs machte man sich das direkt proportionale Verhältnis des während der Reduktion fließenden Stromes zwischen den Elektroden zu der Sauerstoffkonzentration in der Probe zunutze. Ein elektromagnetischer Rührer durchmischte die Probe permanent und verhinderte so eine Sauerstoffverarmung an der Elektrode. Während der Versuche erfolgte die Zugabe von Substanzen durch eine im Verschlussstopfen der Kammer eingebaute Metallkapillare mithilfe von Injektionskanülen. Jede Kammer fasste maximal 2 ml. Die Temperatur wurde konstant bei 30 °C gehalten. Der Sauerstoffverbrauch und dessen erste Ableitung wurde am PC mithilfe der Software DatLab 3.1 (Firma Oroboros, Innsbruck, Österreich) graphisch dargestellt.

2.3.2 Eichung der Sauerstoffelektrode

Beide Kammern des Oxygraphen wurden bei Raumtemperatur mit Medium befüllt, das durch Luft-Begasung mit Sauerstoff aufgesättigt war. Die Konzentration des Sauerstoffs betrug dann ca. 230 nmol/ml Medium. Nach Verschluss der Kammern und Inbetriebnahme der Magnetrührer, wurde mithilfe des Computers die Messung des O₂-Verbrauchs gestartet. Bei konstantem O₂-Gehalt in den Kammern über ca. 20 Sekunden wurde eine Spatelspitze Dithionit (Na₂S₂O₄) beigemischt. Dieses führte zum chemischen Verbrauch des enthaltenen Sauerstoffs, was sich in einer Abnahme der registrierten Spannung widerspiegelte, bis der O₂-Gehalt den Nullwert erreichte. Aus der Differenz der Sauerstoffgehalte vor und nach Zugabe des Dithionits errechnete sich die O₂-Konzentration des Mediums bei Raumtemperatur.

2.3.3 Versuchsablauf

Vor Beginn des Experiments wurden beide Kammern des Oxygraphen wie unter 2.3.2 beschrieben geeicht. Die Versuchskammern wurden mit Medium befüllt. Bei den Sauerstoffverbrauchsmessungen wurden zwei Suspensionsmedien folgender Zusammensetzung vergleichend verwendet:

Sucrose-Medium: 250 mM Sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM KH_2PO_4 , 1 μM EGTA, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; pH 7,2 mit KOH.

KCl-Medium: 150 mM KCl, 20 mM HEPES, 0,1 mM CaCl_2 ; pH 7,2 mit KOH.

Anschließend wurde die Mitochondriensuspension je nach ermittelter Proteinkonzentration zugegeben. Ziel war eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml in der Versuchskammer. Die Zugabe der Substrate erfolgte vergleichend bei den Mitochondrien von Wildtyp- und Ko-Maus jeweils mit und ohne vorherige CsA-Inkubation. Jedem Ansatz wurden zu Beginn die Komplex-I-Substrate Glutamat und Malat zugegeben. Um die maximale respiratorische Aktivität festzustellen, erfolgte in einem Ansatz nach 3-4 min die Zugabe von ADP, in einem weiteren Ansatz die Zugabe von Ca^{2+} und wenig später NADH. Die aufgezeichneten Änderungen des Sauerstoffverbrauchs wurden mithilfe der Software quantifiziert und verglichen. Die Atmung nach ADP erlaubt Aussagen über die maximal mögliche Atmung. Ca^{2+} öffnet die PTP und der Grad der Öffnung konnte durch die Intensität der NADH-induzierten Atmung bestimmt werden.

2.4 Patch-clamp-Experimente

2.4.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsstand für die Patch-clamp-Experimente wurde auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert. Alle Experimente wurden bei einer Raumtemperatur von 23-25 °C mit einem invertierenden Phasen-Kontrast-Mikroskop Axiovert (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) in 40facher Vergrößerung durchgeführt. Das invertierende Mikroskop bietet durch die Anbringung der Objektive unterhalb des Versuchstisches mehr Raum für die Bewegung der Messpipetten oberhalb des Objektes und den

Vorteil eines seitenrichtigen Bildes. Die Messpipetten ließen sich durch einen Linearmotor-getriebenen Mikromanipulator in drei Ebenen bewegen.

Die Mitochondrien wurden in eine mit 2 ml hypotoner Lösung (5 mM HEPES, pH 7,2 mit KOH) befüllte Petrischale auf dem Versuchstisch gegeben. Die hypoosmotische Behandlung führte zum Wassereinstrom in die Mitochondrien mit nachfolgendem Anschwellen und Aufplatzen der äußeren, sowie Entfaltung der inneren Mitochondrienmembran. Die dabei entstehenden, fragilen Vesikel nennt man Mitoplasten. Sie sind aufgrund ihrer streng kugeligen Form und eines deutlichen schwarzen Punktes, der sogenannten cap, die wohl auch aus Resten der aufgeplatzten äußeren Mitochondrienmembran besteht, bei 400facher Vergrößerung gut unter dem Phasenkontrast-Mikroskop zu erkennen. Sie sind für Einzelkanalableitungen an der inneren Mitochondrienmembran geeignet (Sorgato et al. 1989; Moran et al. 1990). Nach 40 Sekunden wurde tropfenweise hypertone Lösung (750 mM KCl, 30 mM HEPES; pH 7,2 mit KOH) zur Wiederherstellung der Isotonizität zugegeben. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung mit 0,2 µm Porenweite gefiltert und zur Stabilisierung der Membran mit 200 µM Ca²⁺ versetzt.

Die Messpipetten wurden vor ihrer Verwendung mit isotoner Lösung befüllt. Dazu wurde zuerst die Spitze der Messpipette unter Unterdruck befüllt, anschließend die restliche Pipette von hinten mit einer Injektionskanüle. Im Versuchstand wurde sie mit leichtem Überdruck zur Vermeidung von Verschmutzung durch Partikel aus der Mitochondriensuspension in die Badlösung eingetaucht und mithilfe des Mikromanipulators dem zu untersuchenden Mitoplasten angenähert. Beim finalen Annähern ohne Überdruck wurde der Mitoplast durch kapillaren Sog an die Messpipette gesaugt. Der Kontakt zwischen Glaspipetten und Mitoplastenmembran sollte sich für bestmögliche Ableitbedingungen im Giga-Ohm Bereich befinden. Man spricht dann vom Giga-seal (Hamill et al. 1981).

Während des Versuches zu applizierende Substanzen, wie CsA, wurden mit einem von einer peristaltischen Pumpe getriebenen Sewer-pipe-System in die Nähe der Messpipette gebracht, die mit einem Mikromanipulator dreidimensional bewegt werden konnte und die zielgenaue Umspülung des Mitoplasten an der Pipettenspitze ermöglichte (Yellen 1982).

Die Patch-clamp-Technik beruht auf dem Prinzip der Spannungsklemme (Voltage-clamp), das heißt, eine Elektrode gibt eine Soll- oder Haltespannung vor, während eine zweite Elektrode die auftretenden Ströme an der zu untersuchenden Membran aufzeichnet. Das bei unserem Versuch entstehende Stromsignal wurde durch eine chlorierte Silberelektrode abgeleitet und durch einen nachgeschalteten Vorverstärker und Strom-Spannungswandler als Spannung ausgelesen. Ein Reizgenerator erzeugte Testimpulse in Rechteckform, wichtig für die Bestimmung der Widerstände. Die Weiterverarbeitung des Signals erfolgte im Hauptverstärker (EPC-7, Heka, Lambrecht, Germany). Das Signal wurde mit einem elektronischen 8-Pol Bessel Tiefpass-Filter bei einer Frequenz von 0,5 kHz gefiltert. Nach Digitalwandlung wurde es mit der Software Clampex 9 (Axon-Instruments, Sunnyvale, CA, USA) dargestellt. Eine Verminderung des störenden 50-Hz-Brummens wurde durch einen den Versuchsaufbau umgebenden Faraday Käfig erreicht.

2.4.2 Herstellung der Glaspipetten

Es wurden Glaspipetten-Rohlinge der Firma Harvard Apparatus Ltd. (Edenbridge, UK) aus Borosilicat-Glas verwendet. Dieses Material ist weniger hart und spröde als Glaskapillaren aus Aluminium-Silicat und lässt sich deshalb besser verarbeiten. Um die Pipetten im Experiment verwenden zu können, mussten daraus Elektroden „gezogen“ werden. Die Rohlinge wurden vorab mit 96% Ethanol gereinigt, um für die Weiterverarbeitung möglichst staub- und fettfrei zu sein. Das Ziehen erfolgte an einem vertikalen David-Kopf-Puller in zwei Schritten zeitnah vor dem Experiment. Ein Wolfram-Filament, dessen Hitze durch die variable Stromzufuhr eingestellt werden konnte, führte zum Schmelzen der Glaskapillare. Im ersten Schritt wurde der Rohling in der Mitte ausgezogen und im zweiten kam es nach Rezentrierung des Rohlings zur Zerreißen der Kapillare an der dünnsten Stelle, sodass man zwei Pipetten erhielt. Wichtig für deren Qualität war der Spitzendurchmesser. Um diesen grob abschätzen zu können, wurde bei jeder Pipette die bubble number bestimmt. Dazu wurde die Pipette mit einem kleinen Plastikschauch auf eine 10 ml-Spritze gesetzt und unter Überdruck in ein Gefäß mit Methanol getaucht. Durch Erhöhung des Druckes stiegen kleine Luftblasen auf. Der entsprechende Überdruck beim Auftreten von Blasen, ergab die bubble number. Ziel war eine bubble number zwischen 4,5

und 5 entsprechend einem Widerstand der Pipette von etwa 11-17 M Ω . Rasterelektronische Aufnahmen haben gezeigt, dass bei gleichem Glas und Elektrodenziehgerät eine bubble number von 4,5 einem Spitzendurchmesser von 0,66 μm entspricht (Ringer 1995). Pipetten mit größerer oder kleinerer Öffnung wurden verworfen.

2.4.3 Vorbehandlung der Elektroden

Chlorierte Silberdrähte wurden als Elektroden verwendet. Die Chlorierung nutzte sich durch häufiges Wechseln der Pipette ab und musste, um ein instabiles Pipettenpotential zu vermeiden, gelegentlich erneuert werden. Die Chlorierung erfolgte nach vorheriger Reinigung an der Kathode durch Anlegen eines Stromes von 1 mA nach der summarischen Gleichung: $2\text{Ag} + 2\text{KCl} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \leftrightarrow 2\text{AgCl} + 2\text{K}^+ + 2\text{OH}^- + \text{H}_2$. Um einen toxischen Einfluss der Silberionen zu vermeiden, wurde die Erdelektrode im Versuchsaufbau über eine Agarbrücke mit der Badlösung verbunden. Bei der Messelektrode war eine solche Protektion wegen des längeren und engeren Diffusionsweges und der kürzeren Standzeit nicht nötig.

2.4.4 Einzelkanalableitungen an der inneren Mitochondrienmembran

Einzelkanalströme durch die PTP wurden im Voltage-clamp-Modus gemessen. Es wurde eine Verstärkung von 20 mV/pA sowie eine Filterfrequenz von 0,5 kHz verwendet. Wichtig für eine gute Ableitung war eine effektive Seal-Bildung mit einem Abdichtwiderstand von mindestens 0,8-1 G Ω . Im Schnitt gelang eine gute Annäherung und Seal-Bildung bei jedem dritten Versuch. Ausschlaggebend war dabei die Wahl eines geeigneten Mitoplasten, der sich relativ nah über dem Boden der Petrischale befand sowie das Aufsetzen der Pipette möglichst gegenüber der cap, um eine Seal-Bildung mit Resten der äußeren Membran zu vermeiden. Etwa zwei Drittel der erfolgreichen Annäherungen zeigten in der Mitoplast-attached-Konfiguration Aktivität der PTP. Das restliche Drittel wies Ableitungen anderer Kanäle der inneren Mitochondrienmembran oder keine Kanalaktivität auf. Für die Messungen wurde ein Haltepotential von +20 mV angelegt. Die Depolarisierung bewirkte hohe PTP-Aktivität, was die Quantifizierung der CsA-Aktivität erleichterte. Bei dieser

Depolarisation und der wegen adäquater Seal-Bildung verwendeten Ca^{2+} -Konzentration von 200 μM waren Mitoplast-attached- und Inside-out-Konfiguration elektrisch nicht zu unterscheiden. Der Konvention für Plasmamembranen folgend, wurde das Haltepotential stets für die Innenseite der Membran angegeben und die Auswärtsströme nach oben dargestellt. Die Aufzeichnung der Ereignisse erfolgte in jeweils einminütigen Dateien mithilfe der Clampex Software (Axon-Instruments, Sunnyvale, CA, USA). Ein gutes Seal blieb selten länger als 25 Minuten stabil, entsprechend ergaben sich daraus bis zu 25 Dateien.

2.4.5 Auswertung

Die gespeicherten Daten wurden mit der Software Clampfit (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA) ausgewertet. Anhand der Stärke des Rauschens sowie Dauer und Amplitude der Offen- und Geschlossen Zustände ließen sich die für eine detaillierte All-point-Analyse der PTP geeigneten Experimente erkennen. Das Besondere an der PTP ist, dass sie verschiedene Unterzustände mit unterschiedlicher Kinetik einnehmen und als vermutlich einziger bekannter Kanal eine Einzelkanalleitfähigkeit von deutlich mehr als 1 nS erreichen kann. Eine solche Einzelkanalregistrierung ist auf **Abb. 9** im Kapitel 3.2.2 zu sehen.

Bei der All-point-Analyse wird in jeder Datei Datenpunkt für Datenpunkt die Amplitude ausgemessen und als Histogramm dargestellt. Es ergeben sich nach Anpassung mithilfe einer Gauß'schen Normalverteilung mehrere Gipfel, die den verschiedenen Offen- und einem Geschlossen Zustand der PTP entsprechen. Die Fläche unter jedem Gipfel entspricht der Anzahl der Messwerte mit der jeweiligen Amplitude und gleich, multipliziert mit der Abtastrate (hier 250 μs), der Verweildauer der PTP im entsprechenden Zustand. Auf der **Abb. 10** im Kapitel 3.2.2 sind solche Histogramme mit Anpassungskurven dargestellt.

2. Material und Methoden

Die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit P_0 für mehrere Kopien mit gleicher Amplitude nur eines Kanaltyps im patch kann mit Gleichung 1 berechnet werden.

$$P_0 = \frac{\sum \text{Offenzeiten}}{\sum \text{Offenzeiten} + \sum \text{Geschlossenzeiten}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Gleichung 1 lässt sich wegen der vielen Unterzustände nicht ohne weiteres auf die PTP übertragen. Berücksichtigt man für die einzelnen Offenzustände der PTP nicht nur die Offenzeiten, sondern auch die jeweils zugehörige Amplitude, kann man die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit unter Berücksichtigung der transportierten Ladungsmenge (proportional der Einzelkanalamplitude) nach Gleichung 2 definieren (Loupatatzis et al. 2002):

$$P_0 = \frac{(B_1 \times P_1) + (B_2 \times P_2) + (B_3 \times P_3) + \dots + (B_n \times P_n)}{B_{\max} \times (P_\emptyset + P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n)} \quad (\text{Gleichung 2})$$

P_n steht dabei für die Fläche unter jeder Gauß'schen Kurve, B_n für die jeweilige Amplitude des Unterzustandes. B_{\max} ist die maximale Öffnungsamplitude der Pore, berechnet aus dem Abstand zwischen den Mittelwerten der Gauß'schen Kurven mit der größten und kleinsten Amplitude, also zwischen geschlossenem und voll geöffnetem Zustand (P_\emptyset und P_n). Bei der Identifizierung und Zuordnung dieser beiden Stromamplituden half die häufig deutlich kleinere Rauschamplitude im Vergleich zu den dazwischen vorkommenden Unterzuständen.

Für die Dosis-Wirkungskurve des CsA wurden jeweils drei bis vier einminütige Aufnahmen der PTP in der Badlösung angefertigt, anschließend erfolgte die Zugabe definierter Konzentrationen von CsA mit weiteren sechs einminütigen Registrierungen, in Einzelfällen bei verminderter Haltbarkeit der patches weniger (minimal drei). Für diese beiden Situationen wurde mit der Gleichung 2 die Gesamtoffenwahrscheinlichkeit errechnet. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden jeweils nur die ersten drei bis vier einminütigen Aufzeichnungen einbezogen.

2. Material und Methoden

Die daraus errechneten Mittelwerte dienten zur Bestimmung der normierten Offenwahrscheinlichkeit der PTP als Relation $P_O(\text{CsA})/P_O(\text{Bad})$, auch bezeichnet als $P_O/P_{O\text{max}}$. Die Punkte auf der Dosis-Wirkungskurve ergaben sich aus den Mittelwerten der Versuche der jeweils getesteten CsA-Konzentration. Die Standardabweichungen sind in der Abbildung dargestellt. Das Programm EnzFitter (Fa. Biosoft, Cambridge, Großbritannien) passte die Punkte für die Dosis-Wirkungskurve an. Eine gute Anpassung gelang mithilfe einer modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (sigmoidale Kinetik, Hill-Koeffizient $n = 1$). Der Term A in Gleichung 3 beschreibt die inkomplette Blockade des Kanals.

$$\frac{P_O}{P_{O\text{max}}} = 1 - A \times \frac{[\text{CsA}]}{[\text{CsA}] + K_m} \quad (\text{Gleichung 3})$$

3. Ergebnisse

3.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen

3.1.1 Keine signifikanten Unterschiede in der State-3-Atmung bei Wildtyp- (WT) und Ko-Maus

In unserem Versuchsansatz arbeiteten wir vergleichend in Sucrose- und in KCl-Medium. Zunächst erfolgte ein Ansatz mit Zugabe von Glutamat/Malat und ADP zur Bestimmung der maximalen Atmungsaktivität (State3). **Abb.4** zeigt WT- und Ko-Mitochondrien nach ADP-Gabe mit einer Steigerung der Substrat-atmung um den Faktor 4,7 beim WT und um den Faktor 7,3 bei der Ko-Maus. Die blaue Kurve zeigt die abnehmende O₂-Konzentration in der Versuchskammer, die rote Kurve die erste Ableitung und damit die Änderung der O₂-Konzentration. Im Mittel erreichten die Mitochondrien Steigerungen um den Faktor $4,3 \pm 0,8$ (WT) und $5,5 \pm 1,8$ (Ko). **Abb.5** zeigt den gleichen Versuchsansatz in KCl-Medium mit einer Steigerung der Substrat-atmung um 7,3 beim WT und 6,8 bei der Ko-Maus. Im Mittel erreichten die Mitochondrien Steigerungen um den Faktor $5,7 \pm 1,9$ für den WT und $6,3 \pm 1,1$ für die Ko-Maus. Wir konnten keine Abhängigkeit der maximal erreichbaren Atmungsaktivität vom verwendeten Medium oder Maustyp feststellen.

3. Ergebnisse

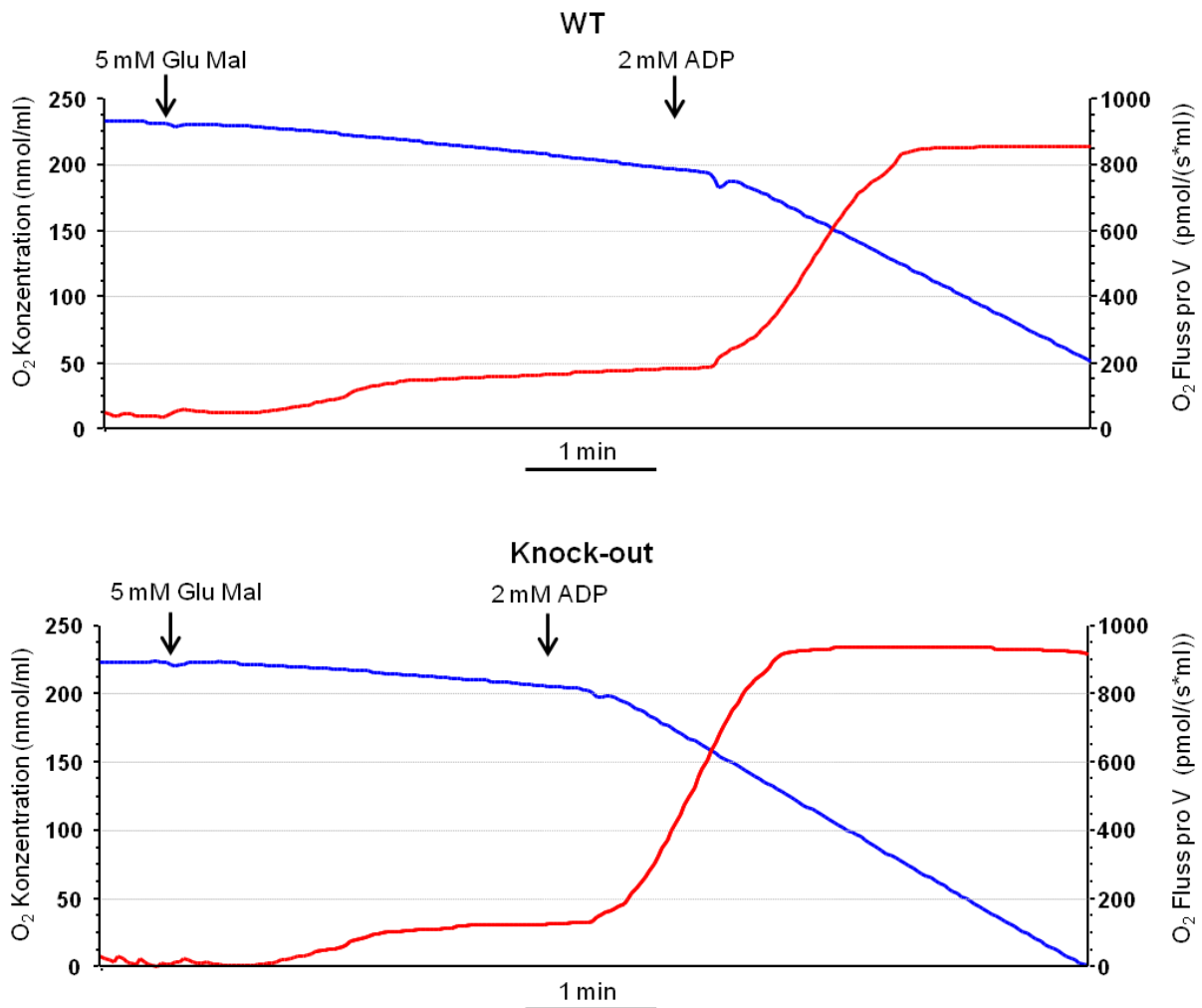


Abbildung 4

O₂-Verbrauchsmessungen zeigen keine signifikanten Unterschiede der State-3-Atmung bei WT und Ko-Maus in Sucrose. Gemessen wurde in Lebermitochondrien-Suspensionen von WT- (oben) und Ko-Maus (unten) in Sucrose-Medium. Die blaue Kurve zeigt die abnehmende O₂-Konzentration in der Versuchskammer, die rote Kurve die erste Ableitung und damit die Änderung der O₂-Konzentration. Die senkrechten Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe der Substrate Glutamat/Malat und ADP. Die Mitochondrien von WT- und Ko-Maus erreichen vergleichbare maximale Atmungsaktivität (Plateau der roten Kurve). Repräsentative Abbildung aus 13 vergleichbaren Versuchen (WT-Maus) und 6 vergleichbaren Versuchen (Ko-Maus).

3. Ergebnisse

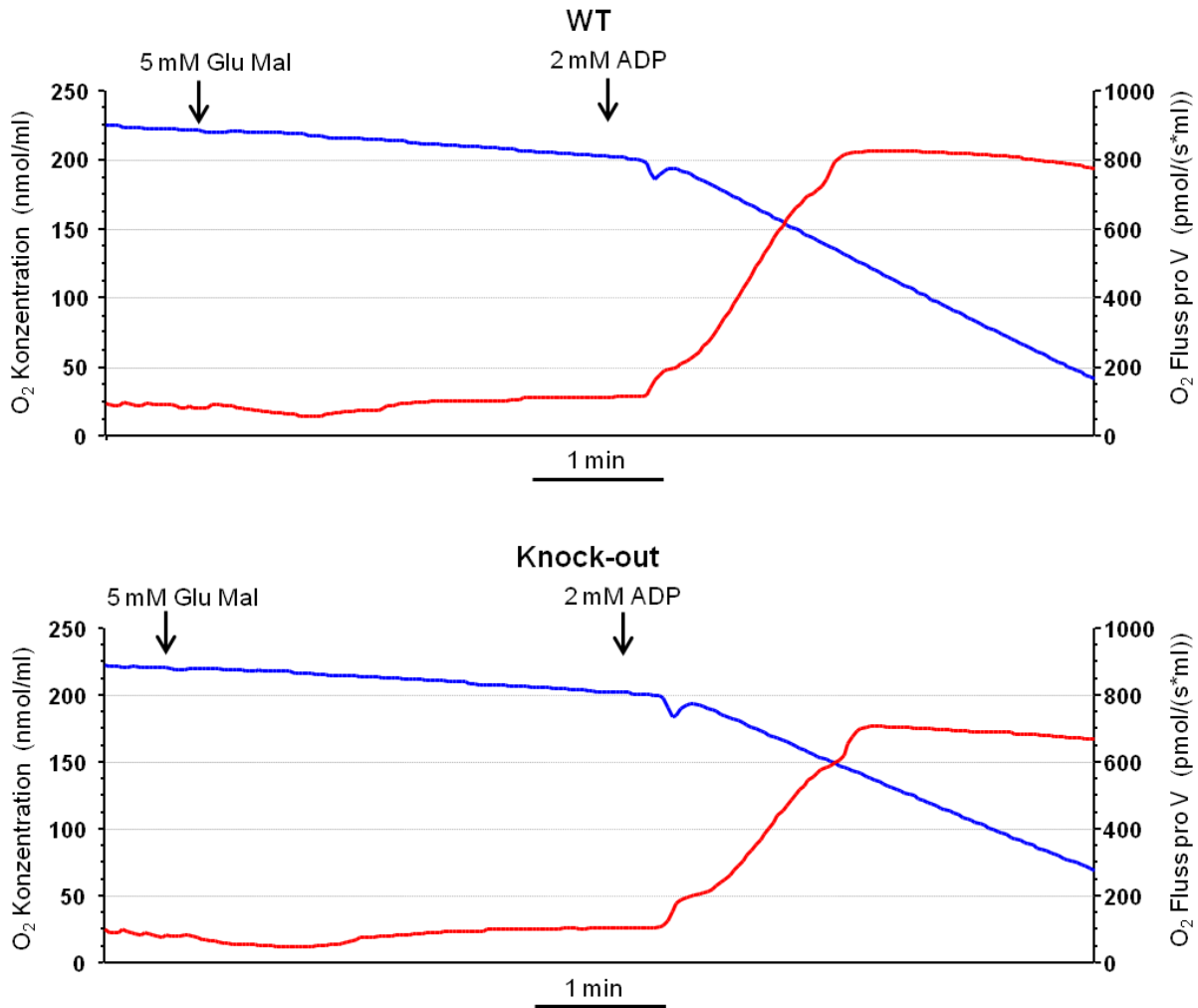


Abbildung 5

O₂-Verbrauchsmessungen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der State-3-Atmung bei WT und Ko-Maus in KCl. Gemessen wurde an Lebermitochondrien von WT- (oben) und Ko-Maus (unten) in KCl-Medium. Die Mitochondrien von WT- und Ko-Maus erreichen vergleichbare maximale Atmungsaktivität (rote Kurve). Repräsentative Abbildung aus 4 vergleichbaren Versuchen bei (WT-Maus) und 6 vergleichbaren Versuchen (Ko-Maus).

3.1.2 Verschiebung der Ca²⁺-Abhängigkeit der PTP bei der Ko-Maus zu höheren Konzentrationen

Um im Experiment eine Öffnung der PTP zu erzeugen, gaben wir Ca²⁺ in die Versuchskammern. Die Zugabe von 50 µM Ca²⁺ steigerte den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch sowohl beim WT als auch bei der Ko-Maus deutlich. Abhängig von $\Delta\Psi$ kommt es zur Aufnahme des freien Ca²⁺ ins Mitochondrium. Das einströmende Ca²⁺ führt zur Öffnung der PTP. Der Ca²⁺-Einstrom und die aus der PTP-Öffnung resultierende Permeabilitätssteigerung der inneren Mitochondrien-

membran führen zu einer Depolarisation, also zur Verkleinerung von $\Delta\Psi$. Um den Ausgangswert von $\Delta\Psi$ wieder zu erreichen, erfolgt eine Steigerung der Zellatmung. Im Versuch äußerte sich das in einem Gipfel in der O_2 -Flusskurve nach Zugabe von Ca^{2+} . Wir arbeiteten mit zwei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen, 50 μM und 1 mM, wobei die höhere Ca^{2+} -Konzentration zu einer stärkeren Öffnung der PTP und damit einem höheren Ca^{2+} -Gipfel führte. Eine gängige Nachweismethode der PTP-Öffnung ist die Zugabe von NADH nach der Ca^{2+} -Zugabe. Das NADH strömt entlang des Konzentrations- und Potentialgradienten durch die PTP in das Mitochondrium ein und beschleunigt dort als Cosubstrat von Komplex I der Atmungskette die Zellatmung. Die Höhe des NADH-Anstiegs in der Flusskurve lässt Rückschlüsse auf den Öffnungsgrad der Pore zu. Eine weit geöffnete PTP lässt viel NADH-Einstrom zu und verursacht damit einen stärkeren Anstieg der Zellatmung als eine Pore mit geringerem Öffnungsgrad. Im Vergleich zum WT zeigten sich bei der Ko-Maus einige Unterschiede. **Abb.6** zeigt ein repräsentatives Experiment in Sucrose-Medium. Der Ca^{2+} -Gipfel bei 50 μM und auch der NADH-Anstieg fielen bei der Ko-Maus kleiner aus. Erst nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} kam es zu einem deutlichen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, offensichtlich durch die weitere Öffnung der PTP und dem damit ermöglichten NADH-Einstrom. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Pore war also zu höheren Ca^{2+} -Konzentrationen verschoben. **Abb.7** zeigt den gleichen Versuchsansatz in KCl-Medium, die Gabe von 1 mM Ca^{2+} ist nicht mit abgebildet, bereits bei 50 μM Ca^{2+} zeigten sich bei WT und Ko-Maus deutliche Unterschiede in der NADH-Antwort.

3. Ergebnisse

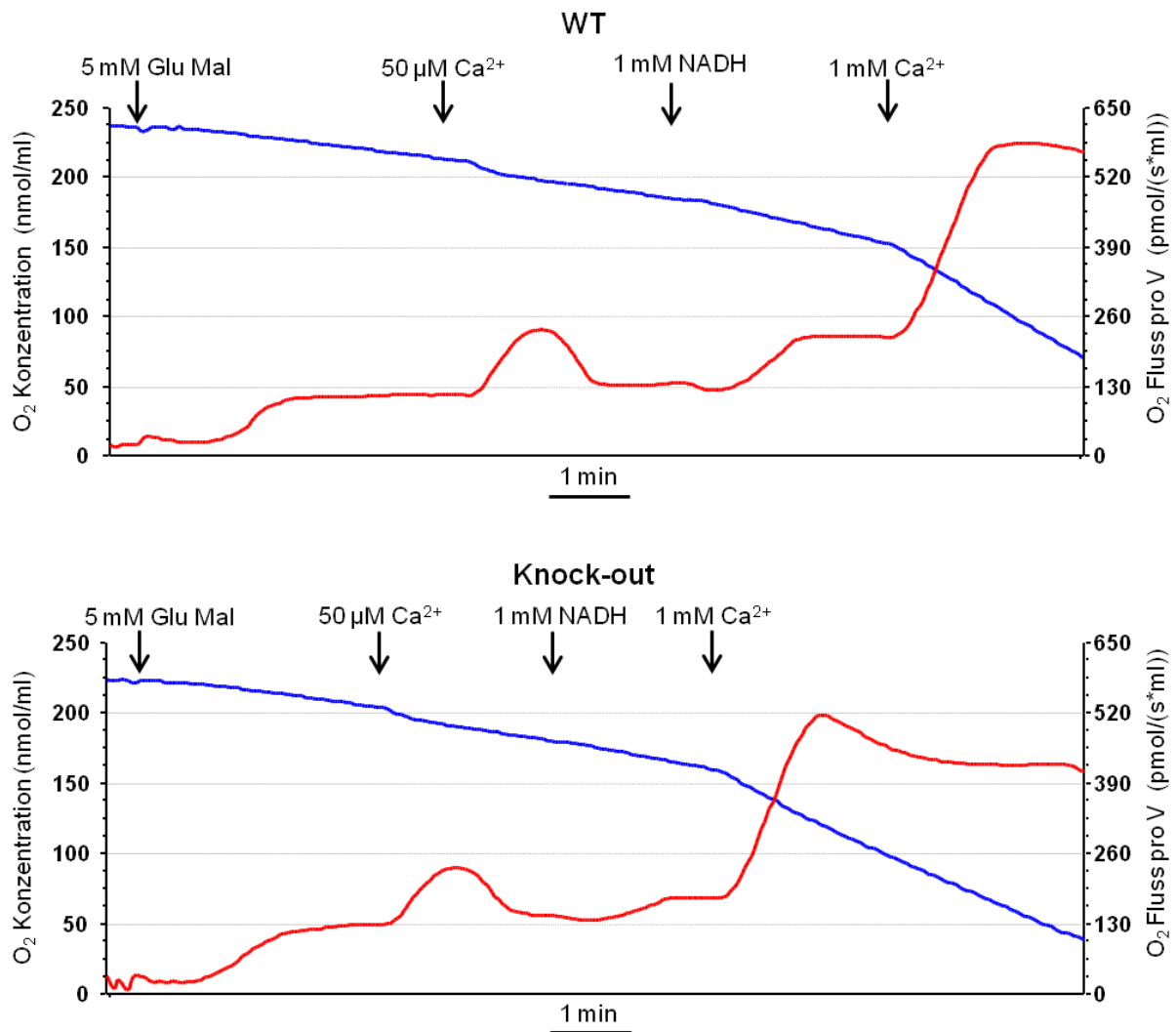


Abbildung 6

Atmungsmessungen an Lebermitochondrien der Ko-Maus in Sucrose-Medium zeigen die Öffnung der PTP bei höheren Ca²⁺-Konzentrationen als beim Wildtyp. Beim WT sieht man bereits nach Applikation von 50 μM Ca²⁺ deutliche Porenöffnung (Plateau der roten Kurve nach NADH-Gabe), bei der Knock-out-Maus erst nach zusätzlicher Gabe von 1 mM Ca²⁺. Repräsentative Abbildung aus 12 vergleichbaren Versuchen (WT-Maus) und 6 vergleichbaren Versuchen (Ko-Maus).

3. Ergebnisse

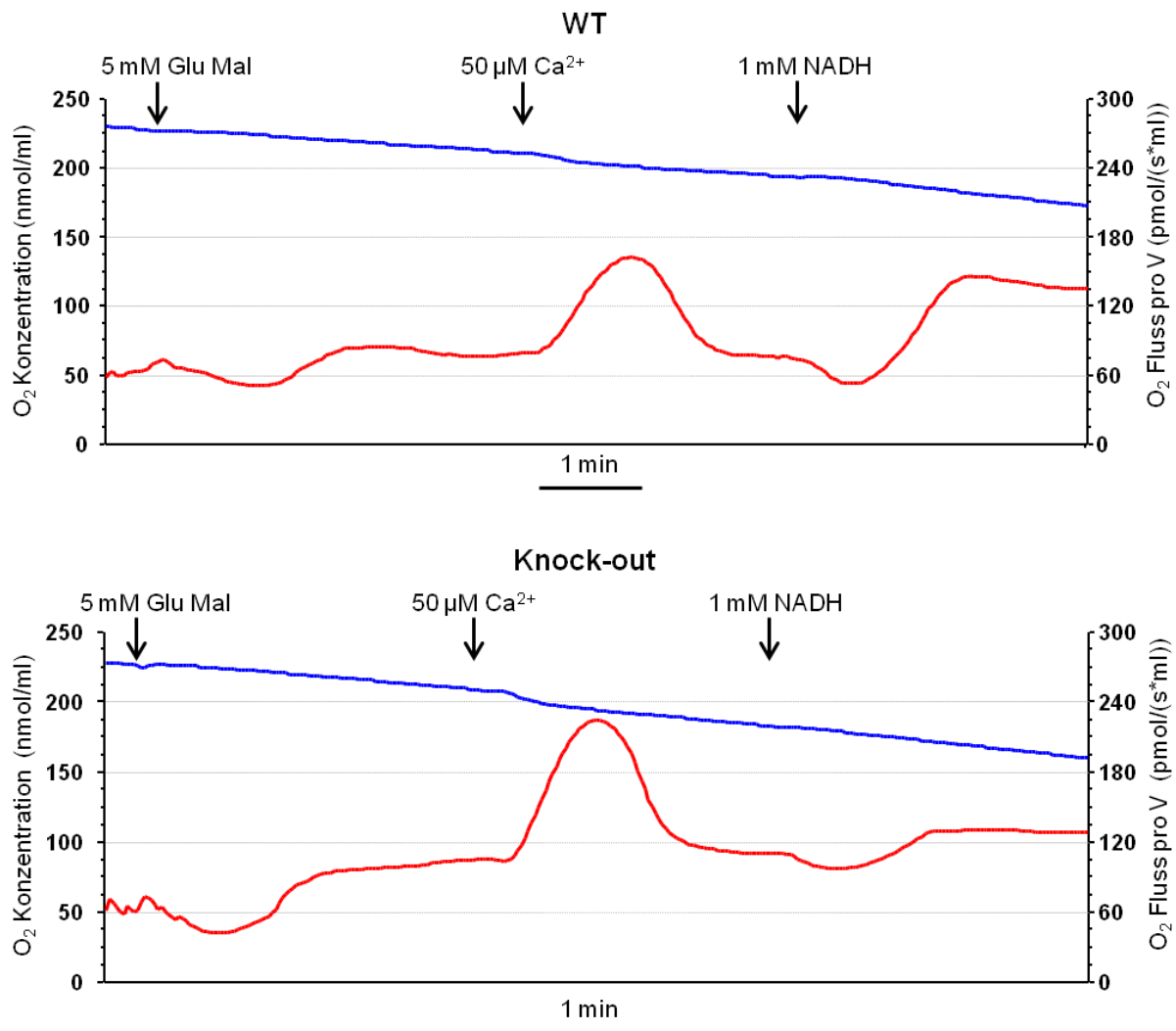


Abbildung 7

Respirometrische Messungen an Lebermitochondrien der Ko-Maus in KCl-Medium zeigen keine Öffnung der PTP bei 50 μM Ca²⁺. Beim Wildtyp sieht man im Gegensatz zur Ko-Maus nach Applikation von 50 μM Ca²⁺ deutliche Porenöffnung, erkennbar am Plateau der roten Kurve nach NADH-Gabe. Repräsentative Abbildung aus 6 vergleichbaren Versuchen (WT-Maus) und 2 vergleichbaren Versuchen (Ko-Maus)

3.1.3 Deutliche Blockade der PTP durch CsA beim WT

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Wirkung von CsA, dem bekannten Inhibitor der PTP mit Bindungsort am CypD, bei WT und Ko-Maus. Nach Vorinkubation mit 2 μM CsA zeigte sich beim WT in Sucrose-Medium nach Gabe von 50 μM Ca²⁺ ein deutlich geringerer Anstieg der NADH-induzierten Atmung (O₂-Fluss pro Volumen (V): 133,1 pmol/(s*ml) in **Abb.8**) als bei der Kontrolle (O₂-Fluss pro V: 223,8

3. Ergebnisse

pmol/(s*ml) in **Abb.6**). Der reduzierte Anstieg deutet auf eine Blockade der PTP durch CsA hin. Erst nach zusätzlicher Gabe von 1 mM Ca^{2+} kam es zu einer Zunahme der Offenzustände der PTP. Ich schließe daraus, dass das bereits in der Versuchskammer vorhandene NADH durch die offene Pore in das Mitochondrium einströmen konnte. In der roten Flusskurve in **Abb.8** zeigt sich dies als deutliche Zunahme der Atmungsaktivität in Form eines Plateaus auf einen maximalen O_2 -Fluss pro V von 329,4 pmol/(s*ml) am Ende der Aufzeichnung. Durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen ließ sich der CsA-Effekt überwinden.

Bei der Knock-out-Maus führte die Vorinkubation mit CsA (untere Flusskurve in **Abb.8**; NADH-induzierte Atmung erreicht O_2 -Fluss pro V von 163,1 pmol/(s*ml)) zu keiner deutlichen Veränderung gegenüber der Kontrolle (**Abb.6**; O_2 -Fluss pro V: 178,3 pmol/(s*ml)). Auch unter CsA öffnete eine hohe Ca^{2+} -Konzentration die Pore in mit der Kontrolle vergleichbarem Maße. Wir stellten also deutliche Ähnlichkeiten im Verlauf der Flusskurven beim WT unter CsA-Einfluss und bei der Ko-Maus unabhängig vom Vorhandensein von CsA fest. Um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des CsA zu testen, führten wir auch Versuche unter Vorinkubation mit 20 μM CsA durch. Beim WT zeigte sich dabei lediglich eine schlechtere Überwindbarkeit des CsA-Effektes durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen. Unter 20 μM CsA erzeugte die Zugabe von 1 mM Ca^{2+} im Mittel maximale O_2 -Fluss-Werte pro V von 273 ± 47 pmol/(s*ml) und ein Plateau bei 211 ± 20 pmol/(s*ml). Bei Vorinkubation mit 2 μM CsA erreichten die Mitochondrien nach Gabe von 1 mM Ca^{2+} im Mittel maximale O_2 -Fluss-Werte pro V von 423 ± 107 pmol/(s*ml) mit anschließendem Plateau bei 349 ± 47 pmol/(s*ml). Deutliche Unterschiede in der Höhe der NADH-induzierten Atmung nach Gabe von 50 μM Ca^{2+} konnten wir nicht feststellen (unter 2 μM CsA 172 ± 32 pmol/(s*ml); unter 20 μM CsA 139 ± 5 pmol/(s*ml)). Bei der Ko-Maus zeigte sich auch unter hoher CsA-Konzentration keine wesentliche Veränderung. Wir konnten ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung von KCl-Medium feststellen. Eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung für CsA an der PTP konnten wir in den Sauerstoffverbrauchsmessungen nicht zeigen.

3. Ergebnisse

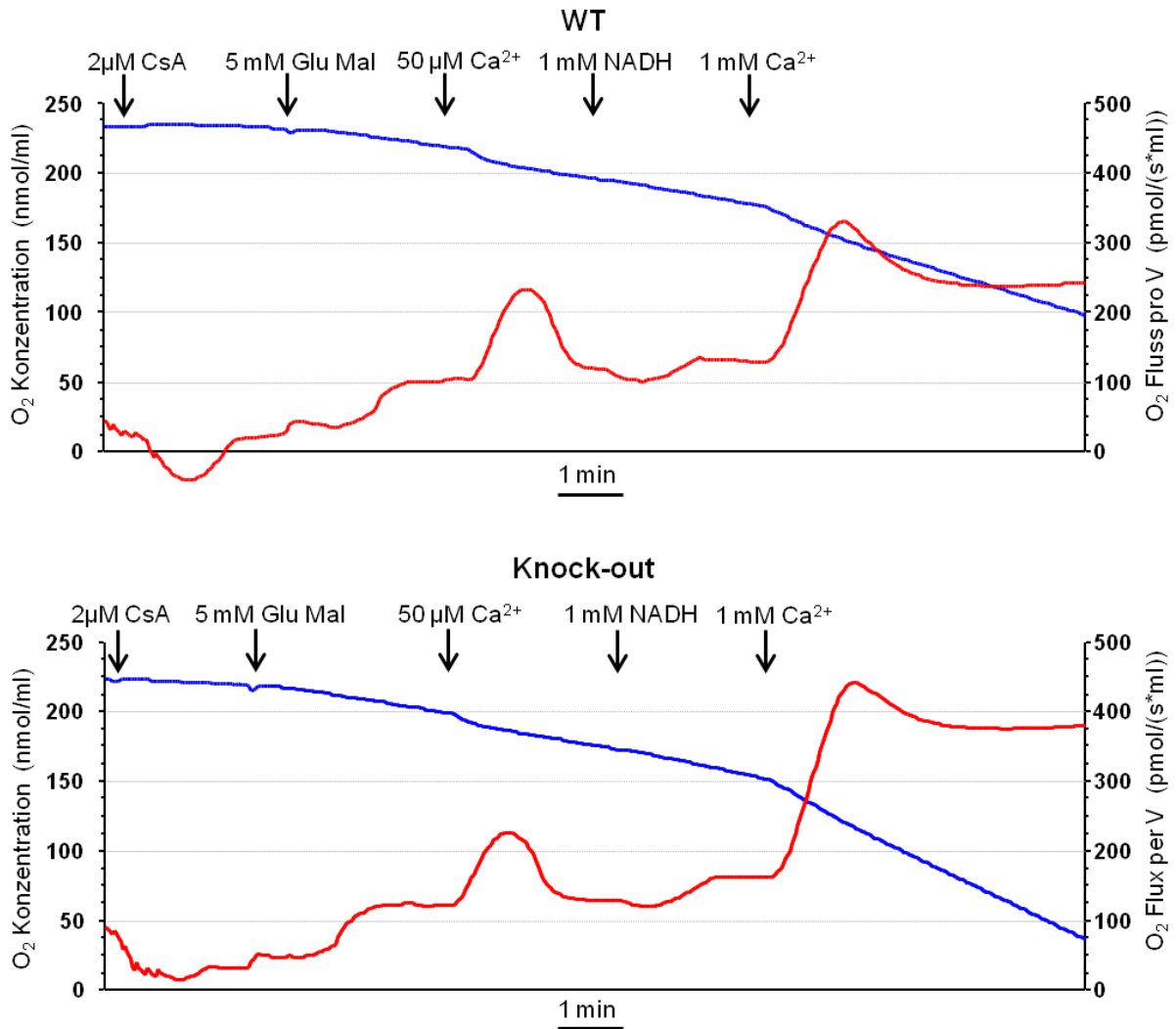


Abbildung 8

Deutliche Blockade der PTP durch CsA beim WT. Atmungsmessungen in Lebermitochondrien-Suspensionen von WT- (oben) und Ko-Maus (unten) in Sucrose-Medium. Das Abfallen der roten Kurve in negative Bereiche zu Beginn beim WT beruht vermutlich auf einem Verdünnungseffekt bei Zugabe des CsA. Beim WT zeigt sich eine deutliche Blockade der PTP (abgeflachter Anstieg der roten Kurve nach NADH-Gabe); 1 mM Ca²⁺ führt zur Überwindung des membranstabilisierenden protektiven CsA-Effektes und öffnet die Pore. Bei der Knock-out-Maus gibt es keinen vergleichbaren Blockierungseffekt durch CsA. Repräsentative Abbildung aus 6 vergleichbaren Versuchen (WT-Maus) und 6 vergleichbaren Versuchen (Ko-Maus).

3.2 Patch-clamp-Experimente

3.2.1 Einzelkanalableitungen eines großen Ionenkanals in der inneren Mitochondrienmembran

Die PTP ist ein großer Ionenkanal in der inneren Mitochondrienmembran mit charakteristischen Eigenschaften, welche die Identifizierung der Pore beim Experimentieren erleichterten. Bei der Messung lagen die Abdichtwiderstände zwischen Pipette und Rattenleber-Mitoplast bei 0,8-1 G Ω . Ein Merkmal waren die verschiedenen Unterzustände der Pore mit sehr unterschiedlicher Kinetik, in der Originalregistrierung deutlich als verschiedene Niveaus erkennbar. Bei lebhafter Kanalaktivität zeigten sich drei Unterzustände besonders häufig. Die maximale Leitfähigkeit betrug 1,4 nS (**Abb.9a**, obere Registrierung). Bei höheren Leitfähigkeiten befanden sich mehrere Kanäle im patch. Die Spannungsabhängigkeit der Pore zeigte sich durch reduzierte Aktivität bei Hyperpolarisierung der Membran. Die Blockade der PTP einschließlich aller Unterzustände durch CsA war das wichtigste Merkmal zur Identifizierung des Kanals (Loupatazsis et al. 2002).

3.2.2 Blockade der PTP durch CsA bei der Wildtyp-Maus effektiver als bei der Ko-Maus

CsA ist ein bekannter Inhibitor der PTP (Szabó und Zoratti 1991). Wir untersuchten die Konzentrationsabhängigkeit des CsA-Effektes an Wildtyp- und Ko-Maus unter Verwendung verschiedener CsA-Konzentrationen. Als Kontrolle dienten jeweils die ersten 3 bis 4 zu Beginn des Experimentes vor Applikation des CsA aufgenommenen einminütigen Dateien. Abhängig von der CsA-Konzentration und der Verwendung von Wildtyp- oder Ko-Mitoplasten kam es zu unterschiedlich starker Inhibition der Kanalaktivität auch in unseren Experimenten (**Abb.9a-c**).

Bei Verwendung von 10 μ M CsA war die Offenwahrscheinlichkeit der PTP (P_o) stark rückläufig und näherte sich null. Die Größenordnung der zum Erreichen vollständiger Inaktivierung der PTP notwendigen CsA-Konzentration war aus der vorher in unserer Arbeitsgruppe an Rattenlebermitoplasten gemessenen Dosis-Wirkungs-Kurve für CsA bekannt (Sayeed et al. 2006). Wir begannen mit 10 μ M CsA und verringerten die Konzentration anschließend in weiteren Experimenten sukzessiv auf 10 nM. Die

3. Ergebnisse

Ca²⁺-Konzentration und der pH-Wert der CsA-Lösung entsprachen denen der Badlösung. Zum Nachweis der Reversibilität der Blockierung bewegten wir die Messpipette am Ende des Experimentes erneut in isotonische Badlösung.

Abb. 9 zeigt Ausschnitte aus Originalregistrierungen dreier Experimente mit CsA. Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Wirksamkeit des CsA an WT- und Ko-Maus beinhaltet die Abbildung ein Experiment mit 100 nM CsA an der WT-Maus sowie zwei Experimenten an der Ko-Maus mit 10 µM CsA und ebenfalls 100 nM. Erst die 100-fach erhöhte Konzentration von CsA zeigt bei der Ko-Maus eine mit dem WT vergleichbare Blockade der Pore.

Mithilfe der durch die All-point-Analyse erstellten Amplitudenhistogramme konnte der Effekt des CsA quantifiziert werden. Änderungen der Offenwahrscheinlichkeiten der Pore spiegeln sich in einer Umverteilung der Ereignisse im Histogramm wieder. **Abb.10** zeigt die Amplitudenhistogramme aus denselben einminütigen Aufzeichnungen, aus denen die Ausschnitte der Originalregistrierungen für **Abb.1** entnommen wurden. Dargestellt sind Werte aus WT-Lebermitoplasten bei 100 nM CsA und aus Knock-out-Lebermitoplasten bei 10 µM CsA (**Abb.9 a, b**). Die vertikalen Pfeile markieren das Geschlossenniveau. Beim Übergang von Badlösung in CsA-Lösung verschiebt sich jeweils die Masse der Punkte in Richtung des Geschlossenniveaus. Sowohl beim WT, als auch bei der Knock-out-Maus ist die Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit durch CsA erkennbar, wenn auch bei der Knock-out-Maus erst bei 100-fach höherer CsA-Applikation.

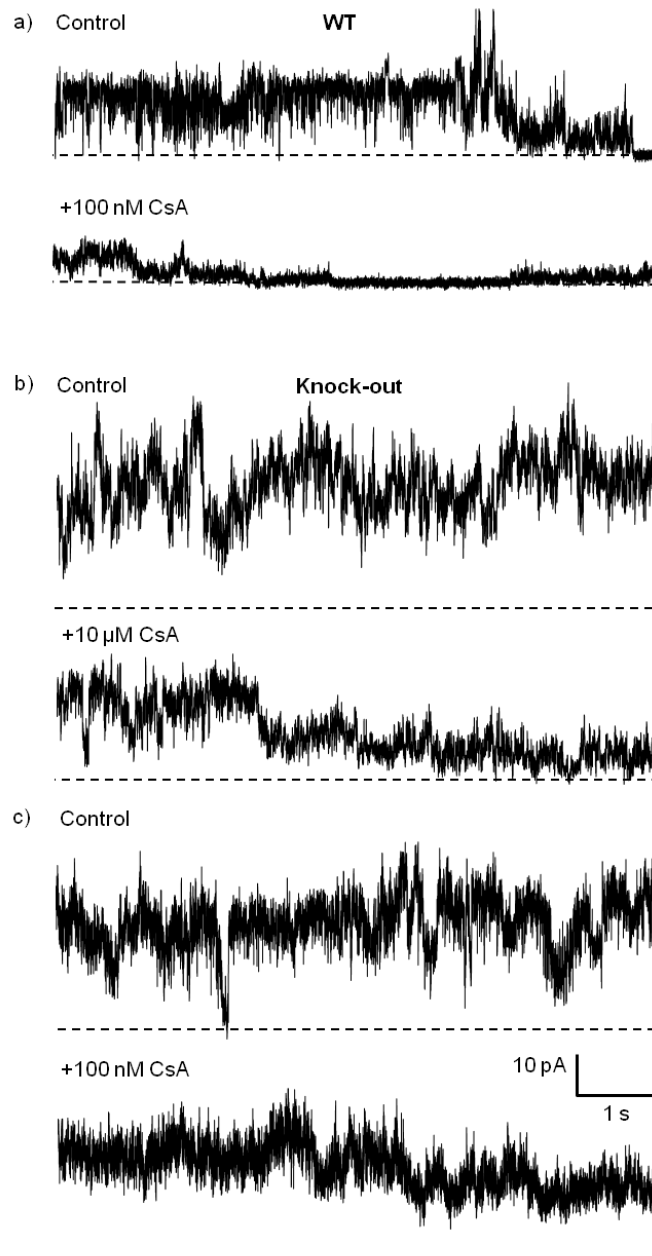


Abbildung 9

Die Blockade der PTP durch CsA erfolgt bei der Wildtyp-Maus bei niedrigeren Konzentrationen als bei der Ko-Maus. Ausschnitte von Originalregistrierungen des Stromes durch die PTP von Lebermitoplasten in „Mitoplast-attached“-Konfiguration a) WT: Control (obere Registrierung): Kanalaktivität in isotonischer Badlösung. Die PTP befindet sich in ca. 80 % der Zeit in deutlich geöffnetem Zustand. Nach Applikation von 100 nM CsA kommt es zum fast vollständigen Schließen der PTP (untere Registrierung). b) Knock-out: Control: Die im Vergleich zu a) deutlich höhere Stromamplitude beruht auf der Anwesenheit von zwei PTPs im patch, die sich in deutlich geöffnetem Zustand befinden. Nach Applikation von 10 μM CsA befinden sich die Poren zu ca. 60% der Zeit in Zuständen nahe dem Geschlossenniveau. c) Knock-out: Control: Zwei PTPs im patch in deutlich geöffnetem Zustand. Nach Applikation der gleichen CsA-Konzentration wie in a) ist kein deutlicher Blockierungseffekt erkennbar; die Poren befinden sich weiter im deutlich geöffneten Zustand. Für alle Registrierungen: $[Ca^{2+}]$: 200 μmol/l; pH 7,2; Haltepotenzial: + 20 mV; T = 24 °C. Die gestrichelte horizontale Linie kennzeichnet das Geschlossenniveau der PTPs.

3. Ergebnisse

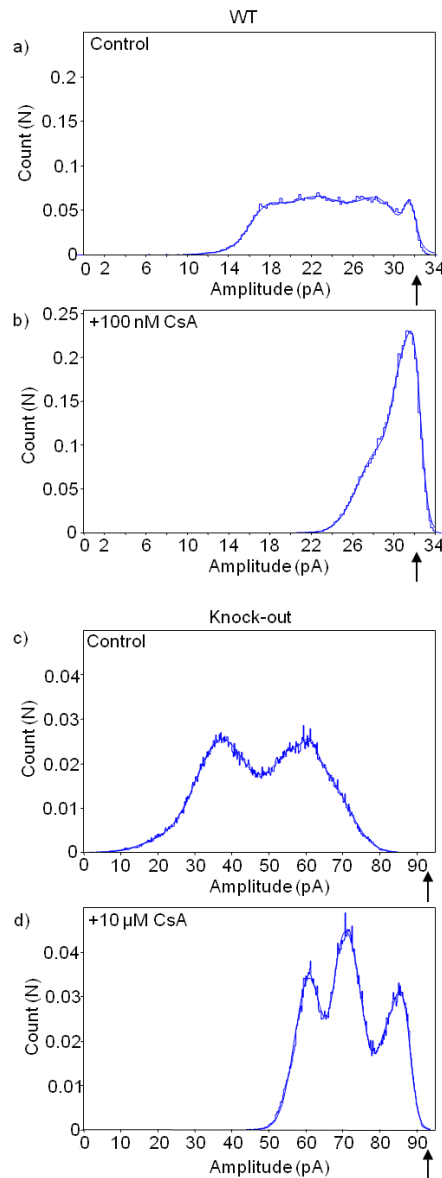


Abbildung 10

Unter CsA-Einfluss zeigt sich beim WT deutlichere Umverteilung des Amplitudenhistogrammes zu niedrigeren Amplituden (nach rechts) als bei der Ko-Maus. Amplitudenhistogramme von Originalregistrierungen von Einzelkanalströmen. Die vertikalen Pfeile kennzeichnen das Geschlossenniveau. a) WT: Kanalaktivität in isotonischer Badlösung. Das Histogramm bildet scheinbar ein Plateau, besteht aber in Wirklichkeit aus sechs überlappenden Gauß-Gipfeln entsprechend den verschiedenen Offenzuständen der PTP. Die Masse der Punkte befindet sich im Bereich der geöffneten Zustände. b) Nach Wechsel in 100 nM CsA. Die Punkte verschieben sich deutlich nach rechts in Richtung Geschlossenniveau. c) Knock-out: Kanalaktivität in isotonischer Badlösung. Der Großteil der Punkte befindet sich im Bereich geöffneter Zustände. d) Nach Wechsel in 10 μ M CsA kommt es zu einer Verteilungsänderung der Punkte in Richtung Geschlossenniveau, im Vergleich zu b) ist jedoch ein deutlich geringerer CsA-Effekt als beim WT erkennbar, viele Punkte befinden sich auch unter der höheren CsA-Konzentration im Bereich der geöffneten Zustände. Für alle Histogramme gilt: Ordinate: normierte Zahl der counts (N); Abszisse: Stromamplitude in pA (negative Auftragung durch die Software vorgegeben). Die durchgezogenen Kurven wurden nach Gleichung 2 mit der pClamp Software an die Histogramme angepasst. $[Ca^{2+}]$: 200 μ mol/l; pH 7,2; Haltepotenzial: + 20 mV; T = 24 °C.

3.2.3 Charakterisierung des Effektes von CsA auf die Offenwahrscheinlichkeit der Pore anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve

Um die Wirksamkeit von CsA an den Mitoplasten der Knock-out-Mäuse genauer zu untersuchen, haben wir Experimente bei verschiedenen CsA-Konzentrationen durchgeführt und anschließend hinsichtlich der Offenwahrscheinlichkeit der PTP analysiert. Aus der Zusammenschau der Ergebnisse der durchgeführten Experimente ergibt sich die in **Abb.11** dargestellte Dosis-Wirkungskurve. Der CsA-Effekt ist über mehrere Minuten progressiv. Um trotz der Auswirkungen dieser Dynamik der PTP-Blockade eine Aussage über die CsA-Konzentrationsabhängigkeit treffen zu können, wurden das Minutensegment der Registrierung, bei dem die Lösung gewechselt wurde, und das nachfolgende Segment bei der Analyse nicht berücksichtigt. Das Eintreten einer vollständigen Blockade der PTP dauerte je nach Experiment mehrere Minuten, teilweise zeigten sich auch nach scheinbar vollständiger Blockade noch kurze Öffnungen. Limitiert wurde das Experiment meist durch die begrenzte Haltbarkeit der einzelnen patches. Die Kurve erreicht also nicht die Abszisse, sondern nähert sich einem niedrigsten Wert A an, welcher bei der Anpassung der Messpunkte berücksichtigt wurde. Es ist bekannt, dass sich Ionenkanäle bei der Bindung von Agonisten hinsichtlich des Ionenflusses ähnlich verhalten wie Enzyme, wodurch ihre Kinetik mit einer modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3) beschrieben werden kann (Hille 2001). Bei ausreichender Zeitdauer hätte sich in unserem Experiment eine P_O nahe null ergeben, aufgrund der Beschränkung auf maximal 4 Minutensegmente konnte jedoch die Geschwindigkeit des Einsetzens des CsA-Effektes als Maß für die Stärke des Effektes verwendet werden.

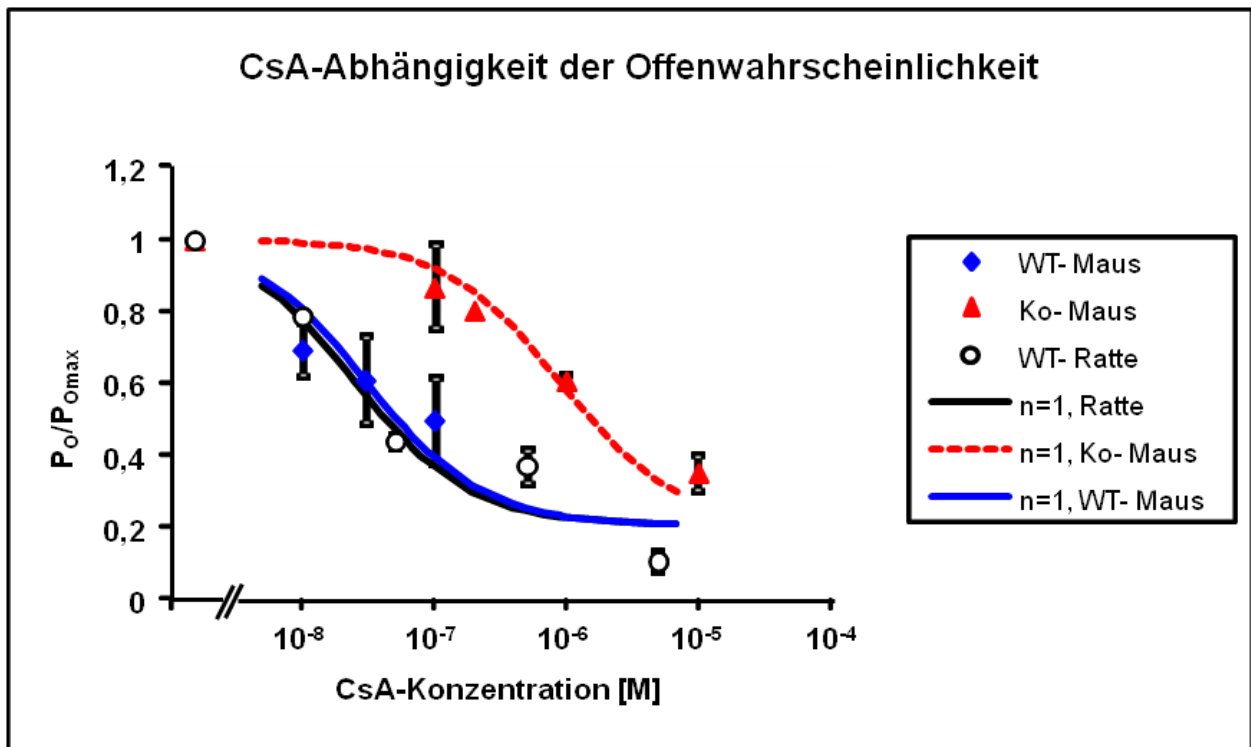


Abbildung 11

Blockierung der PTP durch CsA bei Mäusen mit und ohne CypD. Die CsA-Abhängigkeit der normierten Offenwahrscheinlichkeit der PTP ist in der Knock-out-Maus (Dreiecke, $IC_{50} = 800$ nM) gegenüber WT-Maus (Rauten, $IC_{50} = 31$ nM) und WT-Ratte (Kreise, $IC_{50} = 26$ nM) um 1,5 Größenordnungen hin zu höheren Konzentrationen verschoben. Messungen an Lebermitoplasten in der Mitoplast-attached-Konfiguration. Die Fehlerbalken geben die SEM-Werte an. Die mittlere P_o wurde aus 1-4 unabhängigen Experimenten für jede Konzentration bestimmt. Anpassung der sigmoiden Kurve mithilfe einer modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3) mit $A=0,79$ (Hill-Koeffizient (n) = 1) $[Ca^{2+}]$: 200 μ mol/l; pH 7,2; Haltepotenzial: + 20 mV; T = 24 °C.

4. Diskussion

4.1 Methodenkritik

Wir haben die Aktivität der PTP an der CypD-Knock-out-Maus mit zwei unabhängigen Methoden untersucht. Sowohl die Sauerstoffverbrauchsmessungen als auch die Patch-clamp-Experimente wurden an Lebermitochondrien durchgeführt. Die Sauerstoffverbrauchsmessungen am Oxygraphen sind eine bewährte Methode zur Untersuchung der mitochondrialen Funktion und Messung der Zellatmung. 1989 wurde der Prototyp des Oxygraphen entwickelt, 1992 kam der erste Vertreter dieser Messinstrumente, OROBOROS[®], in den Handel, heute ist er marktführend. Nicht jede Präparation der Mitochondrien aus den Leberzellen weist einen identischen Proteingehalt auf. Um eine Vergleichbarkeit der Versuchsansätze zu gewährleisten, maßen wir den Proteingehalt der Mitochondriensuspension und pipettierten die für eine Konzentration von 1 mg/ml notwendige Menge in die Versuchskammer. Trotzdem konnten die in den Fluxmessungen bestimmte Atmungsaktivität leicht variieren, vermutlich durch geringfügige Abweichungen in den Präparationsbedingungen (Geschwindigkeit, Dauer der Experimente). Jedes einzelne Experiment war durch den begrenzten Sauerstoffgehalt in der Versuchskammer zeitlich limitiert. Wir nahmen dabei an, dass die Atmung bei geringem Restsauerstoff in der Kammer am Ende eines Einzelexperimentes genauso hoch war wie am Beginn, was aber nicht exakt stimmen muss.

Die Anfänge der Patch-clamp-Methode an Mitochondrien gehen auf die 1980er Jahre zurück (Sorgato et al. 1987). Entscheidend war die zweifelsfreie Zuordnung der aufgezeichneten Kanalereignisse zu den Mitochondrien. Das Phasen-Kontrast-, das Elektronen-Mikroskop und der erfolgreiche Nachweis von gegen die innere Mitochondrienmembran gerichteten Antikörpern ermöglichten die eindeutige Identifikation der Mitoplasten (Siemen et al. 1999). Das Auftreten bereits beschriebener Kanäle der inneren Mitochondrienmembran war ebenfalls hilfreich. Die eindeutige Zuordnung der beobachteten Kanalereignisse zur PTP gelang, weil typische Eigenschaften der Pore wie die besonders große Leitfähigkeit von bis zu 1,4 nS, die Ca²⁺-Sensitivität, die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit und die spezifische Blockade durch CsA bekannt waren (Loupatatzis et al. 2002; Sayeed et al., 2006). Für die Untersuchung der biophysikalischen und pharmakologischen

Eigenschaften der PTP ist die Patch-clamp-Technik im Vergleich zu anderen Verfahren besonders geeignet. Die direkte Beobachtung eines einzelnen Kanals kann durch keine andere Methode gewährleistet werden. Bei anderen Verfahren gehen meist Veränderungen indirekter Parameter wie die Abnahme des Membranpotentials oder die Freisetzung intramitochondrialer Apoptose-Mediatoren wie Cytochrom c als Maß für die Aktivität der PTP in die Auswertung ein. Das Flusssystem ermöglicht die Verabreichung von Testsubstanzen direkt auf den einzelnen Mitoplasten und die Beobachtung der Wirkung in Echtzeit. Nicht zu vernachlässigender Nachteil der Methode ist, dass Mitoplasten eine unphysiologische Zustandsform des Mitochondriums sind. Bei der Untersuchung der PTP weist auch die Patch-clamp-Methode eine zeitliche Limitierung durch die begrenzte Haltbarkeit der einzelnen patches auf.

In Bezug auf eventuelle neuroprotektive neben den allgemein zellprotektiven Effekten des CsA liegt die Frage nahe, warum nicht mit Hirnmitochondrien gearbeitet wurde. Untersuchungen der CsA-Wirkung an Hirnmitochondrien zeigen einen deutlichen protektiven Effekt auf die Ca^{2+} -induzierte Öffnung der PTP (Gizatullina et al. 2011). Atmungsmessungen an Hirnmitochondrien der CypD-Ko-Maus sind ebenfalls von Gizatullina et al. durchgeführt worden und werden zur Veröffentlichung eingereicht. Dabei wurde keine klare CsA-Wirkung an der Ko-Maus nachgewiesen. Hirnmitochondrien sind in der Regel deutlich kleiner und weisen eine wesentlich geringere Modulierbarkeit der PTP (Kristal und Dubinsky 1997; Berman et al. 2000) sowie ein einzigartiges Sensitivitätsmuster auf bekannte Inhibitoren der Pore auf (Chinopoulos et al. 2003). Berichte über Patch-clamp-Experimente an Hirngewebe gibt es beispielsweise für den mitochondrialen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal vom BK-Typ bei Astrocytomazellen (Augustynek et al. 2014) und Gliomzellen (Gu et al. 2014), aber nicht für die mitochondriale PTP.

4.2 Effekte von CsA auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch bei Wildtyp- und Knock-out-Maus

Die Atmungsexperimente zeigten deutliche Unterschiede der Ca^{2+} -Abhängigkeit und der CsA-Wirkung bei Wildtyp- und Ko-Maus. Der erste Versuchsansatz mit Bestimmung der State-3-Atmung in weitgehend nicht-ionischem Sucrose- und

physiologischerem KCl-Medium (**Abb. 4, 5**) diene der Feststellung der Vergleichbarkeit der Ausgangsbedingungen. Die Abhängigkeit der Atmung von der Art des Mediums oder dem Maustyp sollte ausgeschlossen werden. Zusammensetzung und Ionenstärke des verwendeten Mediums beeinflussen die Sensibilität isolierter Mitochondrien gegenüber auslösenden oder hemmenden Faktoren der Permeabilitätstransition (Chávez et al. 1991; Chávez et al. 2003; Kupsch et al. 2009). In unseren Experimenten führte weder der Wechsel des Mediums noch die alternative Verwendung von WT- oder Ko-Maus zu einer signifikanten Änderung der State-3-Atmung. Chávez et al., 2003 beschreiben verminderte Blockade durch CsA in Sucrose-Medium bei durch den Entkoppler CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon) induzierter Permeabilitätstransition. Es lag also nahe zu prüfen, inwiefern sich die Verwendung von Sucrose- oder KCl-Medium auf die CsA-Blockade der Ca^{2+} -induzierten Permeabilitätstransition auswirkt. Eine Abhängigkeit der CsA-Wirkung vom Inkubationsmedium konnten wir nicht feststellen.

Im zweiten Versuchsansatz untersuchten wir die Ca^{2+} -Abhängigkeit der PTP bei WT- und Ko-Maus. Diese Experimente dienten gleichzeitig als Kontrolle für den nachfolgenden Einsatz von CsA (**Abb. 6, 7**). Die Zugabe von Ca^{2+} (100 nmol/mg) erhöht die Permeabilität der IMM (Hunter et al. 1976). Die Aufnahme des freien Ca^{2+} ins Mitochondrium erfolgt entlang des elektrochemischen Gradienten durch den hoch selektiven mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (Hajnóczky et al. 2006; Stefani et al. 2011; Baughman et al. 2011; Mallilankaraman et al. 2012). Die Akkumulation von Ca^{2+} in der mitochondrialen Matrix und die damit einhergehende Depolarisation führt zur Öffnung der PTP, wobei die Ko-Mäuse eine deutlich höhere Calcium-Retentionskapazität aufweisen (Basso et al. 2005; Baines et al. 2005). Saures Milieu in der Matrix senkt die Offenwahrscheinlichkeit der Pore (Bernardi et al. 1992). Unsere Ergebnisse bei den Atmungsmessungen passen zu den Beobachtungen von Basso et al., nach denen bei der Ko-Maus im Vergleich zum WT bei der Messung der Calcium-Retentionskapazität etwa die doppelte Menge Ca^{2+} zur Öffnung der Pore notwendig war. In unserem Fall genügte bei der WT-Maus die einmalige Gabe von 50 μM Ca^{2+} um die Pore zu öffnen. 1 mM Ca^{2+} führte zu stärkerer Öffnung der Pore und folglich stärkerer Permeabilitätserhöhung der inneren Mitochondrienmembran, was wiederum eine größere Depolarisation durch den nichtselektiven Einstrom von Ladungsträgern durch die Pore nach sich zieht. Die nachfolgende Steigerung des O_2 -Verbrauchs wird durch die Aktivierung der Atmungskette verursacht, die bestrebt ist,

das ursprüngliche Membranpotential durch Protonentransport aus der Matrix wiederherzustellen.

Es wird diskutiert, dass eine vorübergehende Öffnung der PTP in einem Zustand niedriger Leitfähigkeit möglich ist, in dem die Pore Ca^{2+} -selektiv ist (Icha und Mazat 1998). Das könnte zur Prävention einer mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung im Fall einer starken Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sinnvoll sein (Bernardi und Stockum 2012). Die Anfänge dieser Hypothese gehen auf Altschuld et al. (1992) zurück, die nachwies, dass CsA den Ca^{2+} -Ausstrom aus isolierten Kardiomyozyten deutlich senken konnte. Neuere Untersuchungen an CypD-Knock-out-Mäusen unterstützen diese Hypothese. Elrod et al. (2010) wiesen erhöhte Ca^{2+} -Akkumulation in der mitochondrialen Matrix von Ko-Mäusen nach. Nachfolgend kam es zur Aktivitätserhöhung mitochondrialer Ca^{2+} -abhängiger Dehydrogenasen und zur Umverteilung der Substratverwertung bei Herzarbeit von der Fettsäureoxidation zu Gunsten der Glykolyse. Ko-Mäuse entwickelten im Vergleich zum WT Fettleibigkeit im frühen adulten Alter mit starker Zunahme des weißen Fettgewebes ohne deutliche Änderung der Nahrungsaufnahme (Luvisetto et al. 2008). Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung des Cyclophilin D an der Funktion der PTP beim Ca^{2+} -Ausstrom nahe, was seine Bedeutung bei der Regulierung des globalen Energiehaushaltes unterstreicht. Des Weiteren tolerierten kortikale Neurone aus adulten CypD-Ko-Mäusen höhere mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen und suggerieren damit eine neuroprotektive Wirkung der Inaktivierung des CypD (Barsukova et al. 2011). Die beschriebenen Effekte konnten erst bei sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen beobachtet werden. Möglicherweise werden zunächst bekannte Mechanismen des mitochondrialen Ca^{2+} -Ausstroms durch den $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ - und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher genutzt und das einströmende Ca^{2+} sofort durch Puffersysteme auf niedrigem Niveau gehalten (Chalmers und Nicholls 2003), bevor die Wirkung der CypD-regulierten PTP zum Tragen kommt.

Auf unseren Versuchsansatz übertragen bedeutet das, dass hohe Ca^{2+} -Konzentrationen in den Atmungsmessungen je nach Vorhandensein von CypD unterschiedliche Vorgänge auslösen. Unabhängig von CypD kommt es nach Porenöffnung zur beschriebenen Steigerung der Atmungskettenaktivität, um das ursprüngliche $\Delta\Psi$ wiederherzustellen. Zusätzlich kann die Ca^{2+} -Überladung aber auch mittels Ca^{2+} -Ausstrom durch die CypD regulierte Öffnung der PTP ausgeglichen

werden. Fehlt CypD, kompensieren die Mitochondrien das durch eine deutlich erhöhte Ca^{2+} -Akkumulation in der mitochondrialen Matrix.

Der letzte Versuchsansatz zeigt die Wirkung von CsA (**Abb.8**). In den 1980er Jahren wurde Hemmung der Zellatmung, erhöhte Ca^{2+} -Akkumulation in der mitochondrialen Matrix und die Blockade der PTP als mitochondriale Wirkung von CsA beschrieben (Jung und Pergande 1985; Fournier et al. 1987; Broekemeier et al. 1989; Crompton et al. 1988). Die erhöhte Ca^{2+} -Akkumulation spiegelt sich in unseren Experimenten am WT in der Verschiebung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Porenöffnung zu höheren Konzentrationen nach CsA-Applikation wider. Der Effekt von CsA wird in der Literatur als Desensibilisierung im Sinne einer höheren Resistenz der Pore gegen Öffnung durch Ca^{2+} und P_i beschrieben (Bernardi et al. 2006). In den Atmungsmessungen sahen wir, anders als bei den Patch-Clamp-Experimenten, keine Wirkung von CsA an den Ko-Mäusen. Nakagawa et al. stellten fest, dass bei CypD-Ko-Mäusen die Ca^{2+} -Aktivierung der CsA-sensiblen PTP fehlte (Nakagawa et al. 2005). Fehlende CsA-Empfindlichkeit an Ko-Mäusen bei vorhandener Ca^{2+} -Stimulation der Pore unter hohen Ca^{2+} -Konzentrationen wurde in weiteren Experimenten beschrieben (Basso et al. 2005). Die CsA-Sensitivität hängt von der Stärke der mitochondrialen CypD-Expression sowie dem Vorhandensein von P_i ab (Li et al. 2012). Auch mit höherer CsA-Konzentration konnten wir bei Atmungsmessungen keinen CsA-Effekt beobachten. Die Erarbeitung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung für CsA an den Ko-Maus mithilfe der Sauerstoffverbrauchsmessungen gelang uns nicht. Dieser deutliche Widerspruch zu den Ergebnissen unserer Patch-clamp-Experimente ist schwer zu erklären. Die Methode der Sauerstoffverbrauchsmessung zeigt lediglich ein indirektes Abbild der PTP-Aktivität anhand der erläuterten Änderungen im O_2 -Verbrauch nach Applikation von Ca^{2+} und NADH. Die Messung der PTP im Patch-clamp-Verfahren ermöglicht die Beobachtung der CsA-Wirkung in Echtzeit und ist damit deutlich präziser. Des Weiteren wäre eine Beteiligung von anorganischem Phosphat als Modulator der PTP denkbar. Zahlreiche Studien beschreiben den Zusammenhang von P_i -Gehalt in der Matrix und PTP-Aktivierung (Azzone und Azzi 1965a, 1965b; Crompton et al. 1988; Varanyuwatana und Halestrap 2012). Die Hypothese, dass die PTP-Inhibierung durch an CypD gebundenes CsA P_i -abhängig sei (Basso et al. 2008), konnte in nachfolgenden Experimenten nicht bestätigt werden. Man sah stattdessen, dass P_i keinen Einfluss auf die CsA-Wirkung bei WT-Mäusen oder auf die Offenwahrscheinlichkeit der PTP in Ko-Mäusen hatte (McGee

und Baines 2012) und beobachtete eine von CypD unabhängige porenaktivierende Rolle von P_i (Varanyuwatana und Halestrap 2012). Um diese Ergebnisse mit unseren Versuchen vergleichen zu können, muss bedacht werden, dass das für die Sauerstoffverbrauchsmessungen verwendete Sucrose-Medium P_i enthält, die in den Patch-clamp-Experimenten verwendeten Lösungen aber nicht. Die Hypothese eines P_i -abhängigen CsA-Effektes von Basso et al. lässt sich anhand unserer Patch-clamp-Ergebnisse nicht ohne weiteres überprüfen. Das Vorhandensein von P_i bei den Atmungsmessungen kann also möglicherweise die CsA-Inhibition durch aktivierendes P_i überdecken, denn eine Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte weder beim WT noch bei der Ko-Maus gesehen werden. Die Lösung des Problems liegt keineswegs auf der Hand und bedarf weiterer experimenteller Evaluation.

4.3 Einzelkanalableitungen von der PTP

4.3.1 Einzelkanalableitung der PTP

Die Einzelkanalableitungen an der IMM der Hepatozyten dienten der zweifelsfreien Identifikation der PTP und der Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve für CsA. Wichtig war dabei die Berücksichtigung anderer Faktoren, welche die P_o der PTP hätten beeinflussen können. pH, Ca^{2+} -Konzentration und Depolarisation scheinen keine qualitativen Unterschiede in der Öffnung der PTP zu verursachen (Sullivan et al. 2005). Um auch quantitative Beeinflussungen der P_o zu minimieren, wurden die genannten Parameter in allen Experimenten konstant gehalten. Die Verwendung von $200 \mu M Ca^{2+}$ in Test- und Kontrollösungen garantierte eine anhaltend hohe Kanalaktivität der PTP (Loupatatzis et al. 2002; Hansson et al. 2003).

Das Verhalten der abgeleiteten Kanalaktivität in isoosmotischer Badlösung ohne Testsubstanzen entsprach sehr gut der von Szabó und Zoratti (1992) beschriebenen PTP. Die bei uns beobachtete maximale Leitfähigkeit von 1,4 nS lag nahe der von den o. g. Autoren beschriebenen 1,3 nS. Es gibt nur einen Hinweis auf einen anderen Kanal mit vergleichbar hoher Leitfähigkeit (1 nS) in der Literatur, der aber durch die Signal-Peptide von Proteinen aktiviert wird (Martinez-Caballero et al. 2007). Unterschiede in der Stromamplitude führten wir auf das Vorhandensein von bis zu 2 PTPs in manchen patches zurück. Wir beobachteten häufig stark variierende Kinetik,

Sprünge auf Unterzustände mit geringerer Leitfähigkeit und auch komplette Schließung des Kanals. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Veränderung der Leitfähigkeit durch die Schließung von zwei oder mehr verschiedenen Ionenkanälen zum gleichen Zeitpunkt zustande kam (**Abb. 9a**). CsA verursachte die typische pharmakologische Blockade aller Unterzustände. Für die erfolgreiche Untersuchung des Effektes der Testsubstanz CsA, benötigten wir eine Haltbarkeit des patches von mindestens 15-20 min. Die Lebensdauer der patches wurde durch Haltepotenzial und Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst. Die Verwendung hoher Ca^{2+} -Konzentrationen führt zu höherer Gesamtaktivität der PTP. Ca^{2+} ist membranstabilisierend. Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen bedingen eine geringere Membranflexibilität, was sich nachteilig auf die Haltbarkeit der patches auswirkt. Depolarisierende Haltepotenziale, die zu häufigerem Auftreten des voll geöffneten Zustandes der PTP bei maximaler Leitfähigkeit führen, wirken sich ebenfalls negativ auf die Haltbarkeit des patches aus. Bei einem Haltepotenzial von +20 mV und einer Ca^{2+} -Konzentration von 200 μM erreichten wir bestmögliche Bedingungen. Da höhere Temperaturen die Offenwahrscheinlichkeit der PTP steigern, ist ebenfalls der Einfluss der Raumtemperatur bei den Messungen zu berücksichtigen (Loupataczis et al. 2002). Die Auswirkung kleinerer Schwankungen der Raumtemperatur sollte durch Normierung der Offenwahrscheinlichkeit reduziert werden.

4.3.2 CsA-Effekt auf WT- und Ko-Maus, Charakterisierung anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve

Wir untersuchten Unterschiede in der CsA-Wirkung an WT- und Ko-Maus mithilfe der Patch-clamp-Technik. Erste Untersuchungen zur CsA-Wirkung an der PTP mithilfe der Patch-clamp-Technik wurden von Szabó und Zoratti (1991) an Lebermitoplasten von Ratten durchgeführt. Sie zeigten die Blockade der PTP in der Inside-out-Konfiguration bei CsA-Konzentrationen größer als 0,01 $\mu\text{mol/l}$ im Bad innerhalb einiger Sekunden. Die Applikation der CsA-Konzentrationen von 0,005 bis 2,0 $\mu\text{mol/l}$ über eine 3-5 mm vom patch entfernte Kanüle zeigte keine Beziehung zwischen CsA-Konzentration, Geschwindigkeit des Auftretens der Blockade und Offenwahrscheinlichkeit der Pore. Die Wirkstoffkonzentration an der PTP wurde bei dieser Methode durch Ungenauigkeiten beeinflusst, da ein zeitgleiches Erreichen der

verabreichten Konzentration am Ort der Wirkung nicht gegeben war. Auch mit dem von uns verwendeten Sewer-pipe-System zur Applikation des CsA sind Ungenauigkeiten hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung des Blockade-Effektes nicht auszuschließen. CsA-Konzentration, Entfernung des Flusssystemes von der Pipettenspitze und Temperatur könnten Einfluss auf die Zeitdauer bis zum Eintritt der Wirkung haben. Der Zeitfaktor ist auch bei unseren Messungen eine interessante Größe, da die Inhibition der PTP ein dynamischer Prozess ist, der langsam einsetzend auch bei sehr niedrigen Konzentrationen zur vollständigen Blockade führt, wenn man nur lange genug wartet. Um diese Dynamik auch bei unterschiedlichen Konzentrationen möglichst genau zu erfassen, wurde das Minuten-segment, an dessen Beginn der Lösungswechsel stattgefunden hatte und das durch den Lösungswechsel kleine Messartefakte enthalten konnte, nicht näher analysiert. Für die folgenden 4 min wurde jeweils die P_o bestimmt und gemittelt. Unabhängig vom erreichten Grad der Blockade wurde danach das CsA ausgewaschen und der Grad der Reversibilität bestimmt. Da auf diese Weise am Beginn der Analyse immer noch eine aktive Phase der PTP mit in die Analyse einbezogen wurde, war die Einführung der Größe A in Gleichung 3 sinnvoll, die auch bei hohen CsA-Konzentrationen die anfangs gemessene Restaktivität widerspiegelt.

Auch Szabó und Zoratti beobachteten bei Inkubation von Mitoplasten in der Mitoplast-attached-Konfiguration mit 200 nM CsA eine langsam entstehende Hemmung der PTP. Erst nach ca. 25 min war die volle Blockade erreicht, woraus die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass CsA von der Matrixseite der IMM aus agiert. Loupatatzis et al. (2002) fanden im Patch-clamp-Experiment unter 10 μ M CsA eine Verzögerung von 22 Sek bis zur Sichtbarkeit der Blockade und noch mehrfach kurze Öffnungen der PTP nach dieser Zeit. Bei unseren Experimenten gingen maximal 4 aufgezeichnete Minutensegmente in die Auswertung mit ein. Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch nach dieser Zeit noch weitere Öffnungen der Pore erfolgten. Wir konnten aufgrund dieser kürzeren Messdauer insbesondere bei hohen CsA-Konzentrationen nicht die volle Blockade erfassen, sondern betrachteten die Geschwindigkeit des Einsetzens der Blockade als Maß für die Stärke des CsA-Effektes.

Hansson et al. (2003) untersuchten mithilfe von Schwellungsmessungen an Hirn- und Leberzellmitochondrien der Ratte eventuelle neuroprotektive Effekte von CsA nach

ischämischem Insult. Maximal mögliche Inhibition der Schwellung von Hirn-mitochondrien in $50 \mu\text{mol/l Ca}^{2+}$ als typischer pathologischer Konzentration nach einem Insult wurde bei CsA-Konzentrationen von 500-1000 nmol/l beobachtet. Die logarithmische Dosis-Wirkungs-Beziehung wies einen IC_{50} von 23 nmol/l auf. Aufgrund unterschiedlicher Ca^{2+} -Sensibilität von Mitochondrien verschiedener Gewebe verwendeten Hansson et al. bei den Schwellungsmessungen an Leberzellmitochondrien eine Ca^{2+} -Konzentration von $200 \mu\text{mol/l}$. Die gleiche Konzentration verwendeten wir in unseren Patch-clamp-Experimenten. Hier erreichten Hansson et al. maximale Schwellungsinhibition bereits bei 250 nmol/l CsA, mit einer geschätzten IC_{50} von 25 nmol/l. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für CsA an Einzelkanalmessungen der PTP aus Rattenlebermitoplasten wurde erstmals von Sayeed et al. (2006) untersucht. Bei CsA-Konzentrationen zwischen 10 nM und maximal $5 \mu\text{M}$ und erhielten sie eine IC_{50} von 26 nM (s. **Abb. 11**). Dieser Wert passt gut zu den Ergebnissen von Hansson et al. (2003) und liegt auch nahe der Schätzung von Szabó und Zoratti (1991) von 10 bis 100 nM CsA für eine deutliche Inhibition der PTP.

Einzelkanalmessungen der PTP von CypD-Ko-Mäusen wurden auch von Szabó und Zoratti durchgeführt und zeigten große Ähnlichkeiten der PTPs von WT- und Ko-Mäusen (Marchi et al. 2006). Einziger Unterschied war die fehlende CsA-Sensitivität bei den Ko-Mäusen. Marchi et al. beobachteten außerdem bei 4 von 5 WT-Lebermitoplasten eine inkomplette Blockade der PTP durch CsA mit residualem Kanalfimmern und möglichem Übergang in eine komplette Blockade. Die CsA-induzierte Teilblockade erinnerte deutlich an das unruhige Gating einer unbehandelten PTP. Bei den CypD-Ko-Mäusen trat keine vermehrte CsA-Teilblockade auf. In unseren Patch-clamp-Experimenten an Lebermitoplasten der Ko-Mäuse wurde die PTP nicht komplett unempfindlich auf CsA. Stattdessen stellten wir eine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve um 1,5 Zehnerpotenzen zu höheren Konzentrationen fest (**Abb. 11**). Daraus schließen wir, dass CypD die PTP für CsA sensibilisiert. In hohen Konzentrationen kann CsA die PTP auch in Abwesenheit von CypD blockieren. Die Erklärung dieser Beobachtung ist schwierig. Denkbar wäre das Vorhandensein einer alternativen Bindungsstelle für CsA.

Cyclophiline kommen in vielen verschiedenen Organismen vor, unter anderem beim Menschen (Trandinh et al. 1992), bei dem insgesamt 16 verschiedene Cyclophiline gefunden wurden (Wang und Heitman 2005). CsA bindet an alle diese Cyclophiline und inhibiert die PPlase-Aktivität (Takahashi et al. 1989; Kajitani et al. 2008). Die einzige mitochondriale Isoform der Cyclophiline ist das CypD (Connern und Halestrap 1992; Galat und Metcalfe 1995). Die Bindung des CsA bei der Ko-Maus an ein anderes Cyclophilin erscheint aufgrund des ausschließlich extramitochondrialen Vorkommens der anderen Cyclophilin-Isoformen unwahrscheinlich. Giorgio et al. (2013) beschrieben kürzlich eine Formierung der PTP aus Dimeren der F_0F_1 -ATP-Synthase mit einer CypD-Bindungsstelle am lateralen Stielteil der ATP-Synthase am OSC-Protein (OSCP: oligomycin sensitivity conferring protein) (Giorgio et al. 2009). Die Bindung des CypD verursachte eine partielle Inhibierung der ATP-Synthase-Aktivität. CsA verhinderte die Bindung von CypD an die ATP-Synthase und führte zu einer Enzym-(Re-)Aktivierung. Bei Versuchen an Mitochondrien von CypD-Ko-Mäusen blieb diese stimulierende Wirkung des CsA aus, der Aufbau der ATP-Synthase war nicht verändert. Im Vergleich zu Mitochondrien der WT-Mäuse zeigte das Enzym bei den Ko-Mäusen eine höhere spezifische Aktivität.

Die Bindungsstelle des CypD am OSCP entspricht der Bindungsstelle des Benzodiazepins 423 (Bz-423), einem bekannten Inhibitor der ATP-Synthase (Johnson et al. 2005; Stelzer et al. 2010). Mit dem Wissen um die Bedeutung des CypD für die Permeabilitätstransition vermuteten Giorgio et al. (2013) auch bei Bz-423 eine PTP-induzierende Wirkung. In Gegenwart von Ca^{2+} triggerte die Zugabe von Bz-423 zu den Dimeren der ATP-Synthase die Öffnung eines Kanals mit den typischen Charakteristika der PTP. Man schlussfolgerte auf eine indirekte PTP-induzierende Wirkung von Bz-423 und CypD (mit gleicher Bindungsstelle am OSCP), da beide die sich auf die Permeabilität der IMM auswirkten. Diese dargestellten Zusammenhänge werfen die Frage auf, ob die Anwesenheit des CypD als CsA-Target essentiell für dessen Wirkung ist, oder ob auch ohne CypD eine Wirkung des CsA am OSCP mit Beeinflussung der Offenwahrscheinlichkeit der PTP in deutlich abgeschwächter, aber detektierbarer Form möglich ist. Das entspräche dem Effekt, den wir bei unseren Patch-clamp-Experimenten an den Lebermitoplasten der Ko-Mäuse beobachten konnten. Eine Erklärung unserer Ergebnisse ist nicht trivial. Die Inkonsistenz mit den bisher publizierten Ergebnissen zur CsA-Wirkung an der CypD-Ko-Maus kann nur durch weitere Experimente an Mitochondrien und am PTP-

Einzelkanal beseitigt werden. Die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus des CsA in allen Einzelheiten könnte den Vorteil der Erweiterung des therapeutische Nutzens vom bisherigen Einsatz als Immunsuppressivum zur weiteren Verwendung bei Ischämie-bedingten Krankheitsbildern (Elrod und Molkentin 2013) bringen. Jedes weitere Puzzlestück brächte die Wissenschaft auf dem Weg zur Klärung der tatsächlichen Natur des Phänomens PTP ein Stückchen weiter.

5. Zusammenfassung

Die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (PTP) befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und spielt eine wesentliche Rolle bei den Vorgängen des programmierten Zelltodes. Die Bedeutung der Pore sowie ihre molekulare Struktur war in den vergangenen Jahren Gegenstand von Diskussionen. Das Protein Cyclophilin D ist mit der PTP assoziiert. Der tatsächliche Stellenwert des Cyclophilin D bei der Funktion der Pore ist vielfach kritisch untersucht worden und noch fern ab endgültiger Klärung. Diese Arbeit veranschaulicht anhand von Atmungsmessungen und Patch-clamp-Experimenten an Wildtyp- und Cyclophilin-D-Knock-out-Mäusen die Bedeutung des CypD für das Phänomen permeability transition. Nach Präparation und osmotischer Schwellung wurden aus Lebermitochondrien der Mäuse Mitoplasten hergestellt. Das Aufplatzen der äußeren Membran während der Vorbereitung machte die innere Membran der Untersuchung zugänglich. Mithilfe der Patch-clamp-Technik konnte ein großer Ca^{2+} -abhängiger Kanal mit mehreren Unterzuständen und einer Leitfähigkeit von bis zu 1,3 nS abgeleitet werden. Die Applikation von Cyclosporin A bewirkte deutliche Blockade. Aufgrund der genannten Charakteristika konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um die PTP handelte. Es wurden vergleichende Experimente an WT und Ko-Maus durchgeführt. Eine Charakterisierung des CsA-Effektes auf die Offenwahrscheinlichkeit der Pore gelang durch Verwendung verschiedener CsA-Konzentrationen. Die mithilfe der Michaelis-Menten-Kinetik erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten bei der Ko-Maus im Vergleich zum WT eine Verschiebung der normierten Offenwahrscheinlichkeit der Pore um 1,5 Größenordnungen zu höheren Konzentrationen. In weiteren Experimenten wurde der mitochondriale O_2 -Verbrauch gemessen. Bei der Ko-Maus stellte ich eine Verschiebung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der PTP zu höheren Konzentrationen fest. Eine deutliche Blockade der PTP durch CsA konnte ich respirometrisch nur beim WT darstellen. Die in unseren Patch-clamp-Experimenten gefundene Wirksamkeit von CsA an der CypD-Ko-Maus wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Denkbar wäre das Vorhandensein einer alternativen Bindungsstelle für CsA. Die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus des CsA in allen Einzelheiten, könnte zu einer Erweiterung des therapeutischen Nutzens im Bereich Ischämie-bedingter und Apoptose-assoziiertes Krankheitsbilder führen und wäre ein guter Ansatzpunkt für weitere Experimente.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose	2
Abbildung 2: CypD Interakteure und physiologische Regulierer der PTP	10
Abbildung 3: Strukturformel des CsA.....	11
Abbildung 4: O ₂ -Verbrauchsmessungen zeigen keine signifikanten Unterschiede der State-3-Atmung bei WT und Ko-Maus in Sucrose	25
Abbildung 5: O ₂ -Verbrauchsmessungen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der State-3-Atmung bei WT und Ko-Maus in KCl:	26
Abbildung 6: Atmungsmessungen an Lebermitochondrien der Ko-Maus in Sucrose-Medium zeigen die Öffnung der PTP bei höheren Ca ²⁺ -Konzentrationen als beim Wildtyp.....	28
Abbildung 7: Respirometrische Messungen an Lebermitochondrien der Ko-Maus in KCl-Medium zeigen keine Öffnung der PTP bei 50 µM Ca ²⁺	29
Abbildung 8: Deutliche Blockade der PTP durch CsA beim WT	31
Abbildung 9: Die Blockade der PTP durch CsA erfolgt bei der Wildtyp-Maus bei niedrigeren Konzentrationen als bei der Ko-Maus.....	34
Abbildung 10: Unter CsA-Einfluss zeigt sich beim WT deutlichere Umverteilung des Amplitudenhistogrammes zu niedrigeren Amplituden (nach rechts) als bei der Ko-Maus.....	35
Abbildung 11: Blockierung der PTP durch CsA bei Mäusen mit und ohne CypD ...	37

7. Literaturverzeichnis

1. Adams, J. M.; Cory, S. (2001): Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. In: *Trends in biochemical sciences* 26 (1), S. 61–66.
2. Adrain, C.; Creagh, E. M.; Martin, S. J. (2001): Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. In: *The EMBO journal* 20 (23), S. 6627–6636..
3. Altschuld, R. A.; Hohl, C. M.; Castillo, L. C.; Garleb, A. A.; Starling, R. C.; Brierley, G. P. (1992): Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. In: *Am. J. Physiol.* 262 (6 Pt 2), S. H1699-704.
4. Anholt, R. R.; Aebi, U.; Pedersen, P. L.; Snyder, S. H. (1986): Solubilization and reassembly of the mitochondrial benzodiazepine receptor. In: *Biochemistry* 25 (8), S. 2120–2125.
5. Augustynek, Bartłomiej; Kudin, Alexei P.; Bednarczyk, Piotr; Szewczyk, Adam; Kunz, Wolfram S. (2014): Hemin inhibits the large conductance potassium channel in brain mitochondria: a putative novel mechanism of neurodegeneration. In: *Exp Neurol* 257, S. 70–75.
6. Azzi, A.; Azzone, G. F. (1965): Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria. I. Large amplitude swelling induced by inorganic phosphate and by ATP. In: *Biochimica et biophysica acta* 105 (2), S. 253–264.
7. Azzone, G. F.; Azzi, A. (1965a): Volume changes in liver mitochondria. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 53 (5), S. 1084–1089.
8. Azzone, G. F.; Azzi, A. (1965b): Volume changes induced by inorganic phosphate in liver mitochondria. In: *Biochem J* 94, S. 10C-11C.
9. Baines, Christopher P.; Kaiser, Robert A.; Purcell, Nicole H.; Blair, N. Scott; Osinska, Hanna; Hambleton, Michael A. et al. (2005): Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. In: *Nature* 434 (7033), S. 658–662.
10. Baines, Christopher P.; Kaiser, Robert A.; Sheiko, Tatiana; Craigen, William J.; Molkentin, Jeffery D. (2007): Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. In: *Nature cell biology* 9 (5), S. 550–555.
11. Barsukova, Anna; Komarov, Alexander; Hajnóczky, György; Bernardi, Paolo; Bourdette, Dennis; Forte, Michael (2011): Activation of the mitochondrial permeability transition pore modulates Ca²⁺ responses to physiological stimuli in adult neurons. In: *Eur. J. Neurosci.* 33 (5), S. 831–842.
12. Basso, E.; Fante, L.; Fowlkes, J.; Petronilli, V.; Forte, M. A.; Bernardi, P. (2005): Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (19), S. 18558–18561.

13. Basso, Emy; Petronilli, Valeria; Forte, Michael A.; Bernardi, Paolo (2008): Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. In: *J. Biol. Chem.* 283 (39), S. 26307–26311.
14. Baughman, Joshua M.; Perocchi, Fabiana; Girgis, Hany S.; Plovanich, Molly; Belcher-Timme, Casey A.; Sancak, Yasemin et al. (2011): Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. In: *Nature* 476 (7360), S. 341–345.
15. Berman, S. B.; Watkins, S. C.; Hastings, T. G. (2000): Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria. In: *Exp. Neurol.* 164 (2), S. 415–425.
16. Bernardi, P.; Vassanelli, S.; Veronese, P.; Colonna, R.; Szabó, I.; Zoratti, M. (1992): Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. In: *J. Biol. Chem.* 267 (5), S. 2934–2939.
17. Bernardi, Paolo; Krauskopf, Alexandra; Basso, Emy; Petronilli, Valeria; Blalchy-Dyson, Elizabeth; Di Lisa, Fabio; Forte, Michael A. (2006): The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. In: *FEBS Journal* 273 (10), S. 2077–2099.
18. Bernardi, Paolo; Stockum, Sophia von (2012): The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question. In: *Cell Calcium* 52 (1), S. 22–27.
19. Blatt, N. B.; Glick, G. D. (2001): Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 9 (6), S. 1371–1384.
20. Bonora, Massimo; Bononi, Angela; Marchi, Elena de; Giorgi, Carlotta; Lebedzinska, Magdalena; Marchi, Saverio et al. (2013): Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (4), S. 674–683.
21. Borel, Jean F. (2002): History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. In: *Wiener klinische Wochenschrift* 114 (12), S. 433–437.
22. Brenner, C.; Cadiou, H.; Vieira, H. L.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Xie, Z. et al. (2000): Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. In: *Oncogene* 19 (3), S. 329–336.
23. Brenner-Holzach, O.; Raaflaub, J. (1954): Die Korrelation zwischen der Schwellung isolierter Mitochondrien und dem Abbau der intramitochondrialen Adenosinnucleotide (ATP, ADP, AMP, CoA). In: *Helvetica physiologica et pharmacologica acta* 12 (3), S. 242–252.

24. Broekemeier, K. M.; Dempsey, M. E.; Pfeiffer, D. R. (1989): Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. In: *J Biol Chem* 264 (14), S. 7826–7830.
25. Broekemeier, K. M.; Pfeiffer, D. R. (1989): Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 (1), S. 561–566.
26. Calne, R. Y.; White, D. J.; Thiru, S.; Evans, D. B.; McMaster, P.; Dunn, D. C. et al. (1978): Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. In: *Lancet* 2 (8104-5), S. 1323–1327.
27. Candé, Céline; Cohen, Isabelle; Daugas, Eric; Ravagnan, Luigi; Larochette, Nathanael; Zamzami, Naoufal; Kroemer, Guido (2002): Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. In: *Biochimie* 84 (2-3), S. 215–222.
28. Chalmers, Susan; Nicholls, David G. (2003): The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (21), S. 19062–19070.
29. Chance, B.; Williams, G. R. (1956): The respiratory chain and oxidative phosphorylation. In: *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17, S. 65–134.
30. Chappell, J. B.; Crofts, A. R. (1965): calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria. calcium ion-induced swelling. In: *The Biochemical journal* 95, S. 378–386.
31. Chávez, E.; Moreno-Sánchez, R.; Zazueta, C.; Reyes-Vivas, H.; Arteaga, D. (1991): Intramitochondrial K⁺ as activator of carboxyatractyloside-induced Ca²⁺ release. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1070 (2), S. 461–466.
32. Chávez, Edmundo; García, Noemi; Zazueta, Cecilia; Correa, Francisco; Avilés, César; García, Gerardo; Balam, Eros O. (2003): The composition of the incubation medium influences the sensitivity of mitochondrial permeability transition to cyclosporin A. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 35 (2), S. 149–156.
33. Chinopoulos, Christos; Starkov, Anatoly A.; Fiskum, Gary (2003): Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate. In: *J. Biol. Chem.* 278 (30), S. 27382–27389.
34. Connern, C. P.; Halestrap, A. P. (1992): Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. In: *The Biochemical journal* 284 (Pt 2), S. 381–385.
35. Crompton, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. In: *The Biochemical journal* 341 (Pt 2), S. 233–249.
36. Crompton, M.; Ellinger, H.; Costi, A. (1988): Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. In: *Biochem. J.* 255 (1), S. 357–360.

37. Crompton, M.; Virji, S.; Ward, J. M. (1998): Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. In: *Eur. J. Biochem.* 258 (2), S. 729–735.
38. Damiano, Maria; Starkov, Anatoly A.; Petri, Susanne; Kipiani, Kathuna; Kiaei, Mahmoud; Mattiazzi, Marina et al. (2006): Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. In: *Journal of neurochemistry* 96 (5), S. 1349–1361.
39. Degli Esposti, M. (2002): The roles of Bid. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 7 (5), S. 433–440.
40. Devalaraja-Narashimha, Kishor; Diener, Alicia M.; Padanilam, Babu J. (2009): Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 297 (3), S. F749-59.
41. Elrod, John W.; Molkenin, Jeffery D. (2013): Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. In: *Circ. J.* 77 (5), S. 1111–1122.
42. Elrod, John W.; Wong, Renee; Mishra, Shikha; Vagnozzi, Ronald J.; Sakthivel, Bhuvana; Goonasekera, Sanjeewa A. et al. (2010): Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca²⁺ exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. In: *J. Clin. Invest.* 120 (10), S. 3680–3687.
43. Eskes, R.; Antonsson, B.; Osen-Sand, A.; Montessuit, S.; Richter, C.; Sadoul, R. et al. (1998): Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. In: *The Journal of cell biology* 143 (1), S. 217–224.
44. Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Frasch, S. C.; Warner, M. L.; Henson, P. M. (1998): The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. In: *Cell death and differentiation* 5 (7), S. 551–562.
45. Fischer, G.; Wittmann-Liebold, B.; Lang, K.; Kiefhaber, T.; Schmid, F. X. (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. In: *Nature* 337 (6206), S. 476–478.
46. Fournier, N.; Ducet, G.; Crevat, A. (1987): Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 19 (3), S. 297–303.
47. Galat, Andrzej; Metcalfe, Susan M. (1995): Peptidylproline cis/trans isomerases. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 63 (1), S. 67–118.
48. Giorgio, Valentina; Bisetto, Elena; Soriano, Maria Eugenia; Dabbeni-Sala, Federica; Basso, Emy; Petronilli, Valeria et al. (2009): Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (49), S. 33982–33988.

49. Giorgio, Valentina; Stockum, Sophia von; Antoniel, Manuela; Fabbro, Astrid; Fogolari, Federico; Forte, Michael et al. (2013): Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (15), S. 5887–5892.
50. Gizatullina, Zemfira Z.; Gaynutdinov, Timur M.; Svoboda, Hanno; Jerzembek, Doreen; Knabe, Annette; Vielhaber, Stefan et al. (2011): Effects of cyclosporine A and its immunosuppressive or non-immunosuppressive derivatives [D-Ser]8-CsA and Cs9 on mitochondria from different brain regions. In: *Mitochondrion* 11 (3), S. 421–429.
51. Green, D. R.; Amarante-Mendes, G. P. (1998): The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. In: *Results and problems in cell differentiation* 24, S. 45–61.
52. Gross, A.; McDonnell, J. M.; Korsmeyer, S. J. (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. In: *Genes & development* 13 (15), S. 1899–1911.
53. Gross, V. (2012): Immunsuppression bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen: Wann, wie und wie lange? In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 137 (37), S. 1803–1805.
54. Gu, Xiang Q.; Pamerter, Matthew E.; Siemen, Detlef; Sun, Xiaolu; Haddad, Gabriel G. (2014): Mitochondrial but not plasmalemmal BK channels are hypoxia-sensitive in human glioma. In: *Glia* 62 (4), S. 504–513.
55. Gurney, M. E.; Pu, H.; Chiu, A. Y.; Dal Canto, M C; Polchow, C. Y.; Alexander, D. D. et al. (1994): Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5166), S. 1772–1775.
56. Hajnóczky, György; Csordás, György; Das, Sudipto; Garcia-Perez, Cecilia; Saotome, Masao; Sinha Roy, Soumya; Yi, Muqing (2006): Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. In: *Cell Calcium* 40 (5-6), S. 553–560.
57. Halestrap, A. P.; Davidson, A. M. (1990): Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. In: *The Biochemical journal* 268 (1), S. 153–160.
58. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: *Pflügers Arch.* 391 (2), S. 85–100.
59. Hansson, Magnus J.; Persson, Tanja; Friberg, Hans; Keep, Marcus F.; Rees, Anthony; Wieloch, Tadeusz; Elmér, Eskil (2003): Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. In: *Brain Research* 960 (1–2), S. 99–111.

60. Harding, M. W.; Galat, A.; Uehling, D. E.; Schreiber, S. L. (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. In: *Nature* 341 (6244), S. 758–760.
61. Hausenloy, Derek J.; Boston-Griffiths, E. A.; Yellon, D. M. (2012): Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. In: *British journal of pharmacology* 165 (5), S. 1235–1245.
62. Haworth, R. A.; Hunter, D. R. (2000): Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32 (1), S. 91–96.
63. Hayashi, T.; Nagasue, N.; Kohno, H.; Chang, Y. C.; Nakamura, T. (1991): Beneficial effect of cyclosporine pretreatment in canine liver ischemia. Enzymatic and electronmicroscopic studies. In: *Transplantation* 52 (1), S. 116–121.
64. Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. In: *Nature* 407 (6805), S. 770–776.
65. Hille, Bertil (2001): Ionic channels of excitable membranes. 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinaur Associates.
66. Hockenbery, D.; Nuñez, G.; Millman, C.; Schreiber, R. D.; Korsmeyer, S. J. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. In: *Nature* 348 (6299), S. 334–336.
67. Horvitz, H. R.; Shaham, S.; Hengartner, M. O. (1994): The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 59, S. 377–385.
68. Huai, Qing; Kim, Hwa-Young; Liu, Yudong; Zhao, Yingdong; Mondragon, Angelo; Liu, Jun O.; Ke, Hengming (2002): Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), S. 12037–12042.
69. Hunter, D. R.; Haworth, R. A.; Southard, J. H. (1976): Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. In: *J. Biol. Chem.* 251 (16), S. 5069–5077.
70. Hunter, F. E.; Ford, L. (1955): Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions. In: *The Journal of biological chemistry* 216 (1), S. 357–369.
71. Ichas, F.; Mazat, J. P. (1998): From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. In: *Biochimica et biophysica acta* 1366 (1-2), S. 33–50.

72. Johnson, Kathryn M.; Chen, Xueni; Boitano, Anthony; Swenson, Lara; Opipari, Anthony W.; Glick, Gary D. (2005): Identification and validation of the mitochondrial F1F0-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. In: *Chemistry & biology* 12 (4), S. 485–496.
73. Johnson, N.; Khan, A.; Virji, S.; Ward, J. M.; Crompton, M. (1999): Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 263 (2), S. 353–359.
74. Jung, K.; Pergande, M. (1985): Influence of cyclosporin A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria. In: *FEBS Lett.* 183 (1), S. 167–169.
75. Kajitani, Kenji; Fujihashi, Masahiro; Kobayashi, Yukiko; Shimizu, Shigeomi; Tsujimoto, Yoshihide; Miki, Kunio (2008): Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-Å resolution. In: *Proteins* 70 (4), S. 1635–1639.
76. Karn, Pankaj Ranjan; Kim, Hyun Do; Kang, Han; Sun, Bo Kyung; Jin, Su-Eon; Hwang, Sung-Joo (2014): Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. In: *International journal of nanomedicine* 9, S. 3791–3800.
77. Kawano, K.; Kim, Y. I.; Kaketani, K.; Kobayashi, M. (1989): The beneficial effect of cyclosporine on liver ischemia in rats. In: *Transplantation* 48 (5), S. 759–764.
78. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *British journal of cancer* 26 (4), S. 239–257.
79. Kinnally, K. W.; Zorov, D. B.; Antonenko, Y. N.; Snyder, S. H.; McEnery, M. W.; Tedeschi, H. (1993): Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (4), S. 1374–1378.
80. Kirkinezos, Ilias G.; Hernandez, Dayami; Bradley, Walter G.; Moraes, Carlos T. (2004): An ALS mouse model with a permeable blood-brain barrier benefits from systemic cyclosporine A treatment. In: *Journal of neurochemistry* 88 (4), S. 821–826.
81. Kokoszka, Jason E.; Waymire, Katrina G.; Levy, Shawn E.; Sligh, James E.; Cai, Jiyang; Jones, Dean P. et al. (2004): The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. In: *Nature* 427 (6973), S. 461–465.
82. Kristal, B. S.; Dubinsky, J. M. (1997): Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: induction by calcium cycling-dependent and -independent pathways. In: *J. Neurochem.* 69 (2), S. 524–538.

83. Kroemer, G. (1997): The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. In: *Nature medicine* 3 (6), S. 614–620.
84. Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S. A. (1997): Mitochondrial control of apoptosis. In: *Immunology today* 18 (1), S. 44–51.
85. Kupsch, Kathleen; Hertel, Silvia; Kreuzmann, Peter; Wolf, Gerald; Wallesch, Claus-Werner; Siemen, Detlef; Schönfeld, Peter (2009): Impairment of mitochondrial function by minocycline. In: *The FEBS journal* 276 (6), S. 1729–1738.
86. Lê Quốc, K.; Lê Quốc, D. (1988): Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 265 (2), S. 249–257.
87. Lehninger, A. L. (1959): Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. In: *The Journal of biological chemistry* 234, S. 2465–2471.
88. Lehninger, A. L.; Ray, B. L.; Schneider, M. (1959): The swelling of rat liver mitochondria by thyroxine and its reversal. In: *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 5 (1), S. 97–108.
89. Lemasters, J. J.; Qian, T.; Elmore, S. P.; Trost, L. C.; Nishimura, Y.; Herman, B. et al. (1998): Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. In: *Biofactors* 8 (3-4), S. 283–285.
90. Li, Bo; Chauvin, Christiane; Paulis, Damien de; Oliveira, Frédéric de; Gharib, Abdallah; Vial, Guillaume et al. (2012): Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (9), S. 1628–1634.
91. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S.; Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. In: *Cell* 91 (4), S. 479–489.
92. Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. In: *Cell* 66 (4), S. 807–815.
93. Loupatatzis, Christos; Seitz, Gordon; Schönfeld, Peter; Lang, Florian; Siemen, Detlef (2002): Single-channel currents of the permeability transition pore from the inner mitochondrial membrane of rat liver and of a human hepatoma cell line. In: *Cell. Physiol. Biochem.* 12 (5-6), S. 269–278.
94. Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in

- response to activation of cell surface death receptors. In: *Cell* 94 (4), S. 481–490.
95. Luvisetto, S.; Basso, E.; Petronilli, V.; Bernardi, P.; Forte, M. (2008): Enhancement of anxiety, facilitation of avoidance behavior, and occurrence of adult-onset obesity in mice lacking mitochondrial cyclophilin D. In: *Neuroscience* 155 (3), S. 585–596.
96. Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A. (2003): The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8 (2), S. 115–128.
97. Mallilankaraman, Karthik; Cárdenas, César; Doonan, Patrick J.; Chandramoorthy, Harish C.; Irrinki, Krishna M.; Golenár, Tünde et al. (2012): MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cellular metabolism. In: *Nat. Cell Biol.* 14 (12), S. 1336–1343.
98. Marchi, Umberto de; Basso, Emy; Szabò, Ildikò; Zoratti, Mario (2006): Electrophysiological characterization of the Cyclophilin D-deleted mitochondrial permeability transition pore. In: *Mol. Membr. Biol.* 23 (6), S. 521–530.
99. Martinez-Caballero, Sonia; Grigoriev, Sergey M.; Herrmann, Johannes M.; Campo, María Luisa; Kinnally, Kathleen W. (2007): Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (6), S. 3584–3593.
100. Marzo, I.; Brenner, C.; Zamzami, N.; Jürgensmeier, J. M.; Susin, S. A.; Vieira, H. L. et al. (1998): Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5385), S. 2027–2031.
101. McEnery, M. W.; Snowman, A. M.; Trifiletti, R. R.; Snyder, S. H. (1992): Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8), S. 3170–3174.
102. McGee, Allison M.; Baines, Christopher P. (2012): Phosphate is not an absolute requirement for the inhibitory effects of cyclosporin A or cyclophilin D deletion on mitochondrial permeability transition. In: *Biochem. J.* 443 (1), S. 185–191.
103. Mihatsch, M. J.; Olivieri, W.; Marbet, U.; Thiel, G.; Harder, F.; Zollinger, H. U. (1981): Giant mitochondria in renal tubular cells and cyclosporin A. In: *Lancet* 1 (8230), S. 1162–1163.
104. Moran, O.; Sandri, G.; Panfili, E.; Stühmer, W.; Sorgato, M. C. (1990): Electrophysiological characterization of contact sites in brain mitochondria. In: *J. Biol. Chem.* 265 (2), S. 908–913.

105. Muzio, M. (1998): Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. In: *International journal of clinical & laboratory research* 28 (3), S. 141–147.
106. Nakagawa, Takashi; Shimizu, Shigeomi; Watanabe, Tetsuya; Yamaguchi, Osamu; Otsu, Kinya; Yamagata, Hirotaka et al. (2005): Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. In: *Nature* 434 (7033), S. 652–658.
107. Narita, M.; Shimizu, S.; Ito, T.; Chittenden, T.; Lutz, R. J.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. (1998): Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (25), S. 14681–14686.
108. Padosch, S. A.; Vogel, P.; Böttiger, B. W. (2001): Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie. Grundlagen, Pathophysiologie und Interventionsmöglichkeiten. In: *Der Anaesthetist* 50 (12), S. 905–920.
109. Park, Jeong Soon; Pasupulati, Ratna; Feldkamp, Thorsten; Roeser, Nancy F.; Weinberg, Joel M. (2011): Cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules after hypoxic and ischemic injury. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 301 (1), S. F134-50.
110. Parone, Philippe A.; Da Cruz, Sandrine; Han, Joo Seok; McAlonis-Downes, Melissa; Vetto, Anne P.; Lee, Sandra K. et al. (2013): Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (11), S. 4657–4671.
111. Puthalakath, H.; Strasser, A. (2002): Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. In: *Cell death and differentiation* 9 (5), S. 505–512.
112. Raaflaub, J. (1953): Die Schwellung isolierter Leberzellmitochondrien und ihre physikalisch-chemische Beeinflussbarkeit. In: *Helv Physiol Pharmacol Acta* 11 (2), S. 142–156.
113. Ragam, Ashwinee; Kolomeyer, Anton M.; Kim, Jason S.; Nayak, Natasha V.; Fang, Christina; Kim, Elliott; Chu, David S. (2014): Topical cyclosporine a 1% for the treatment of chronic ocular surface inflammation. In: *Eye & contact lens* 40 (5), S. 283–288.
114. Ringer, Elisabeth (1995): Ionenkanäle in Weißen Fettzellen. Buch ; Dissertation / Habilitation, Regensburg, Univ., Diss., 1995.
115. Savill, J. (1997): Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. In: *British medical bulletin* 53 (3), S. 491–508.

116. Sayeed, Iqbal; Parvez, Suhel; Winkler-Stuck, Kirstin; Seitz, Gordon; Trieu, Isabelle; Wallesch, Claus-Werner et al. (2006): Patch clamp reveals powerful blockade of the mitochondrial permeability transition pore by the D2-receptor agonist pramipexole. In: *FASEB J.* 20 (3), S. 556–558.
117. Schinzel, Anna C.; Takeuchi, Osamu; Huang, Zhihong; Fisher, Jill K.; Zhou, Zhipeng; Rubens, Jeffery et al. (2005): Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (34), S. 12005–12010.
118. Shimizu, S.; Matsuoka, Y.; Shinohara, Y.; Yoneda, Y.; Tsujimoto, Y. (2001): Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. In: *The Journal of cell biology* 152 (2), S. 237–250.
119. Shimizu, S.; Narita, M.; Tsujimoto, Y. (1999): Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. In: *Nature* 399 (6735), S. 483–487.
120. Siemen, D.; Loupatatzis, C.; Borecky, J.; Gulbins, E.; Lang, F. (1999): Ca²⁺-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (2), S. 549–554.
121. Sorgato, M. C.; Keller, B. U.; Stühmer, W. (1987): Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. In: *Nature* 330 (6147), S. 498–500.
122. Sorgato, M. C.; Moran, O.; Pinto, V. de; Keller, B. U.; Stuehmer, W. (1989): Further investigation on the high-conductance ion channel of the inner membrane of mitochondria. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 21 (4), S. 485–496.
123. Starzl, T. E.; Klintmalm, G. B.; Porter, K. A.; Iwatsuki, S.; Schröter, G. P. (1981): Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. In: *The New England journal of medicine* 305 (5), S. 266–269.
124. Stefani, Diego de; Raffaello, Anna; Teardo, Enrico; Szabò, Ildikò; Rizzuto, Rosario (2011): A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. In: *Nature* 476 (7360), S. 336–340.
125. Stelzer, Andrew C.; Frazee, Richard W.; van Huis, Chad; Cleary, Joanne; Opipari, Anthony W.; Glick, Gary D.; Al-Hashimi, Hashim M. (2010): NMR studies of an immunomodulatory benzodiazepine binding to its molecular target on the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. In: *Biopolymers* 93 (1), S. 85–92.
126. Sullivan, P. G.; Rabchevsky, A. G.; Waldmeier, P. C.; Springer, J. E. (2005): Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? In: *J. Neurosci. Res.* 79 (1-2), S. 231–239.

127. Svarstad, Hanne; Bugge, Hans Chr.; Dhillon, Shivcharn S. (2000): From Norway to Novartis: cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime. In: *Biodiversity and Conservation* 9 (11), S. 1521–1541.
128. Szabó, I.; Zoratti, M. (1991): The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. In: *J. Biol. Chem.* 266 (6), S. 3376–3379.
129. Szabó, I.; Zoratti, M. (1992): The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 24 (1), S. 111–117.
130. Takahashi, N.; Hayano, T.; Suzuki, M. (1989): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. In: *Nature* 337 (6206), S. 473–475.
131. Tanveer, A.; Virji, S.; Andreeva, L.; Totty, N. F.; Hsuan, J. J.; Ward, J. M.; Crompton, M. (1996): Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 238 (1), S. 166–172.
132. Trandinh, C. C.; Pao, G. M.; Saier, M. H. (1992): Structural and evolutionary relationships among the immunophilins: two ubiquitous families of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6 (15), S. 3410–3420.
133. Tsujimoto, Yoshihide; Nakagawa, Takashi; Shimizu, Shigeomi (2006): Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (9-10), S. 1297–1300.
134. van Loo, G.; Saelens, X.; van Gorp, M.; MacFarlane, M.; Martin, S. J.; Vandenamee, P. (2002): The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. In: *Cell death and differentiation* 9 (10), S. 1031–1042.
135. Varanyuwatana, Pinadda; Halestrap, Andrew P. (2012): The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. In: *Mitochondrion* 12 (1), S. 120–125.
136. Verhagen, A. M.; Ekert, P. G.; Pakusch, M.; Silke, J.; Connolly, L. M.; Reid, G. E. et al. (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. In: *Cell* 102 (1), S. 43–53.
137. Vogt, Carl (1842): Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte. (*Alytes obstetricians*). Hg. v. Jent und Gassmann. Solothurn.
138. Wang, Ping; Heitman, Joseph (2005): The cyclophilins. In: *Genome biology* 6 (7), S. 226.

139. Wang, Xiaoyang; Carlsson, Ylva; Basso, Emy; Zhu, Changlian; Rousset, Catherine I.; Rasola, Andrea et al. (2009): Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (8), S. 2588–2596.
140. Whelan, Russell S.; Konstantinidis, Klitos; Wei, An-Chi; Chen, Yun; Reyna, Denis E.; Jha, Saurabh et al. (2012): Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17), S. 6566–6571.
141. Wieckowski, M. R.; Wojtczak, L. (1998): Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. In: *FEBS letters* 423 (3), S. 339–342.
142. Yamanoi, A.; Nagasue, N.; Kohno, H.; Chang, Y. C.; Hayashi, T.; Nakamura, T. (1991): Attenuation of ischemia-reperfusion injury of the liver in dogs by cyclosporine. A comparative study with allopurinol and methylprednisolone. In: *Transplantation* 52 (1), S. 27–30.
143. Yellen, G. (1982): Single Ca²⁺-activated nonselective cation channels in neuroblastoma. In: *Nature* 296 (5855), S. 357–359.
144. Zamzami, N.; Kroemer, G. (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (1), S. 67–71.
145. Zamzami, N.; Marchetti, P.; Castedo, M.; Zanin, C.; Vayssière, J. L.; Petit, P. X.; Kroemer, G. (1995): Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 181 (5), S. 1661–1672.
146. Zimmermann, K. C.; Bonzon, C.; Green, D. R. (2001): The machinery of programmed cell death. In: *Pharmacology & therapeutics* 92 (1), S. 57–70.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Detlef Siemen für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion. Er hat mich mit beeindruckender Geduld in die Elektrophysiologie und das wissenschaftliche Arbeiten im Labor eingeführt und stand stets mit Rat und Tat zur Seite. Er zeigte großes Verständnis und Geduld bei den Verzögerungen, die durch die Geburt meines Sohnes beim Beenden der Arbeit verursacht wurden.

Ich danke der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die Unterstützung durch das Promotionsstipendium im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei PD Dr. F. N. Gellerich, Herrn M. Schindler, Frau K. Kaiser, Frau C. Höhne, Frau J. Witzke und Frau Z. Gizatullina, die mich bei technischen Problemen bei der Arbeit im Labor unterstützten und mit einigen guten Ideen weiterhalfen. Ich habe das Arbeitsklima im Neurobiochemischen Labor immer als sehr angenehm empfunden.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die vielen motivierenden Worte bedanken. Besonders meinen Eltern und meinem Freund danke ich für das Verständnis, die fortwährende Ermunterung, die stete Diskussionsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung in der finalen Phase bei der Durchsicht des Manuskriptes.

9. Ehrenerklärung

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

„Untersuchungen zur Aktivität der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore in der Cyclophilin-D-Knock-out-Maus (Ppif^{-/-})“

Im Neurobiochemischen Labor der Klinik für Neurologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit der Unterstützung durch

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Detlef Siemen

ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe 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

10. Bildungsweg

Bildungsweg

- Ab 02/2015 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin in der Heliosklinik Schkeuditz
- 11/2013-01/2015 Promotionsstudium an der OvGU Magdeburg
- 05/2014-10/2014 Förderung durch ein Promotionsstipendium der OvGU Magdeburg im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe (nach Geburt eines Sohnes im November 2013)
- 10/2013 Absolvierung der 2. Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin
- 2007-2013 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 07/2007 Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium Springe
- 2004-2005 Austauschjahr in San Francisco, Córdoba, Argentinien
- 1997-1999 Orientierungsstufe Nord, Springe
- 1996-1997 Pestalozzi-Schule, Hameln
- 1994-1996 Kidugala International School, Tansania
- 1993-1994 Fernschule Itete, Tansania
- Geboren am 09.04.1987

Publikation

- Siemen D., Ziemer, M. (2012) What is the Nature of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and What is it Not? IUBMB Life. 65, 255-62