

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

Kann die gewebeprotective Wirkung von Erythropoetin  
durch die Blockade der *permeability transition pore* erklärt werden?

# **D i s s e r t a t i o n**

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Maire Käding  
aus Berlin  
Halle (Saale), 2018

## Bibliographische Beschreibung:

Käding, Maire:

Kann die gewebeprotective Wirkung von Erythropoetin durch die Blockade der *permeability transition pore* erklärt werden? – 2018. -62 Bl., 23 Abb., 6 Tab.

## Kurzreferat

Erythropoetin (EPO) ist ein Wachstumsfaktor, der seit langem in der Anämietherapie eingesetzt wird. Studien der letzten 20 Jahren bewiesen zusätzlich einen gewebeprotectiven Effekt. Vermutet wird eine Hemmung der Apoptose über die Inhibition der *permeability transition pore* (PTP). Unsere Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob dieser Effekt nur über den gewebeprotectiven EPO-Rezeptor (*innate repair receptor* - IRR) zu erzielen ist, oder ob es möglicherweise eine direkte Bindungsstelle von EPO an der PTP gibt. Hierzu führten wir Sauerstoffverbrauchs-, Membranpotential- und Schwellungsmessungen an Rattenhirn- und Rattenlebermitochondrien durch. Weder mit Human- oder Ratten-EPO noch mit dem modifizierten Epoetin alfa oder dem EPO-Derivat ARA 290 ließ sich eine reproduzierbare Wirkung auf die PTP nachweisen. Effekte auf den Sauerstoffverbrauch, die Schwellung und das Membranpotential ließen sich auf die zur Stabilisierung und Konservierung hinzugefügten Zusatzstoffe Na-Citrat (Human-EPO) und Polysorbat 80/20 (Epoetin alfa) zurückführen. Hieraus ergibt sich die Frage, wie bedenklich eine Anwendung von Epoetin alfa und Human-EPO sowohl im klinischen Umfeld als auch im Rahmen von Studien ist.

## **Schlüsselwörter**

Mitochondrien, Erythropoetin, *permeability transition pore*, Gewebeprotection, Sauerstoffverbrauchsmessungen, Ratte

*für Victoria und Israel,  
breakers of chains, healers of hearts*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	1
<b>2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	3
<b>3. TABELLENVERZEICHNIS</b>	5
<b>4. EINLEITUNG</b>	6
<b>4.1 Mitochondrien</b>	6
4.1.1 Die verschiedenen „States“ der respiratorischen Aktivität isolierter Mitochondrien	6
4.1.2. Mitochondrien und Zelltod	7
4.1.2.1. Apoptose	7
4.1.2.2. Nekrose	9
4.1.3 <i>mitochondrial permeability transition</i> (MPT)	9
4.1.3.1 Struktur der <i>permeability transition pore</i> (PTP)	10
4.1.3.2 Physiologie und Pathologie der <i>permeability transition pore</i>	11
4.1.3.3 Modulation der <i>permeability transition pore</i>	12
<b>4.2 Erythropoetin</b>	13
4.2.1. Das erythropoetische Erythropoetin	13
4.2.2 Das gewebeprotective Erythropoetin	14
4.2.3 Entwicklung nicht-erythropoetischer, gewebeprotectiver EPO-Derivate	17
<b>4.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	19
<b>5. MATERIAL UND METHODEN</b>	20
<b>5.1 Material</b>	20
<b>5.2 Methoden</b>	25
5.2.1 Präparation von Mitochondrien aus Rattenleber (RLM)	25

5.2.2 Präparation von Mitochondrien aus Rattenhirn (RHM)	26
5.2.3 Proteinbestimmung	26
5.2.4 Schwellungsmessungen	27
5.2.5 Membranpotentialmessungen	28
5.2.6 Sauerstoffverbrauchsmessungen	29
5.2.7 Statistische Analyse	31
<b>6. ERGEBNISSE</b>	32
<b>6.1. Atmungsmessungen</b>	32
6.1.1 Atmungsmessungen mit Epoetin alfa und Rattenlebermitochondrien (RLM) im Saccharose-Medium	32
6.1.2 Atmungsmessungen mit Epoetin alfa und Rattenhirnmitochondrien (RHM) im Hansson-Medium	35
6.1.3 Atmungsmessungen mit Human-EPO und RLM im Saccharose-Medium	39
6.1.4 Atmungsmessungen mit ARA 290 und RLM im Saccharose- Medium	47
6.1.5 Atmungsmessungen mit ARA 290 und RHM im Hansson- Medium	49
6.1.6 Atmungsmessungen mit Ratten-EPO und RLM im Saccharose-Medium	50
<b>6.2 Schwellungsmessungen</b>	51
6.2.1 Schwellungsmessungen mit Human-EPO und RLM im Hansson-Medium	51
6.2.2 Schwellungsmessungen mit ARA 290 und RLM im Hansson- Medium	54
<b>6.3 Membranpotentialmessungen</b>	55
6.3.1 Membranpotentialmessungen mit Human-EPO und Na- Citrat/NaCl im Saccharose-Medium (mit RLM) und Hansson-Medium (mit RHM)	55
6.3.2 Membranpotentialmessungen mit ARA 290 und RLM und RHM im Hansson und Saccharose-Medium	57

<b>7. DISKUSSION</b>	58
<b>7.1 Überlegungen zur klinischen Anwendung und zur Dosisfindung</b>	58
<b>7.2 Polysorbat bedingt die durch Epoetin alfa verursachte Verminderung der Atmung bei RHM</b>	59
<b>7.3 Das in Human-EPO enthaltene Na-Citrat führt über eine Bindung von Ca<sup>2+</sup> zu einer unechten Blockade der PTP</b>	61
<b>7.4 ARA 290 und Ratten-EPO haben keinen Effekt auf die PTP</b>	63
<b>7.5 RHM und RLM verhalten sich unterschiedlich</b>	63
<b>7.6 Sonstige Überlegungen</b>	65
<b>7.7 Schlussfolgerung</b>	66
<b>8. ZUSAMMENFASSUNG</b>	67
<b>9. LITERATUR</b>	68
<b>10. DANKSAGUNG</b>	77

# 1. Abkürzungsverzeichnis

ADI	<i>acceptable daily intake</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
ANT	<i>adenine nucleotide translocase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma xL</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bz-423	Benzodiazepin 423
Ca <sup>2+</sup>	freie Calciumionen
CEPO	Carbamyliertes EPO
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CRC	<i>calcium retention capacity</i>
CsA	Cyclosporin A
Cyp D	Cyclophilin D
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
eNOS	endotheliale Nitritoxidsynthase
EPO	Erythropoetin
EPOR/R <sub>2</sub>	EPO-Rezeptor/Homodimer
ESA	<i>erythropoiesis-stimulating agent</i>
FADH <sub>2</sub> /FAD	Flavinadenindinucleotid
Fas/FasR	<i>first apoptosis signal receptor</i>
Glu/Mal	Glutamat/Malat
GSK-3β	<i>glycogen synthase kinase 3 β</i>
H <sup>+</sup>	Protonen
HIF-1-alpha	<i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
IE	Internationale Einheit
IM	<i>inner membrane</i>
IRR	<i>innate repair receptor</i>
JAK-2	Januskinase 2
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
Mg <sup>2+</sup>	freie Magnesiumionen
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
NADH/NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OM	<i>outer membrane</i>
OSCP	<i>oligomycin sensitivity-conferring protein</i>
p75NTR	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
PEG	Polyethylenglycol

P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRCA	<i>pure red cell aplasia</i>
PTP	<i>permeability transition pore</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rtPA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
STAT 5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR-1	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
U	<i>unit</i>
VDAC	<i>voltage dependant anion channel</i>
$\beta$ cR	<i><math>\beta</math> common receptor</i>



## 2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1.3.1:	Schematisierte Darstellung der $F_0F_1$ -ATP Synthase.	11
Abb. 4.2.2.2:	Signaltransduktionswege und Effekte des IRR.	16
Abb. 4.2.3.1:	Schematisierte Darstellung von EPO und dessen Bindung an den EPOR <sub>2</sub> sowie von ARA 290.	18
Abb. 6.1.1a-d:	Epoetin alfa bewirkt keinen Unterschied in der NADH-Atmung.	34
Abb. 6.1.1e:	Der Anstieg der NADH-Antwort nach Vorinkubation mit Epoetin alfa entspricht unabhängig von der Konzentration ungefähr dem Anstieg der NADH-Atmung ohne Vorinkubation mit Epoetin alfa.	34
Abb. 6.1.1f:	100 $\mu$ M $Ca^{2+}$ öffnet die PTP nicht vollständig.	35
Abb. 6.1.2a-e:	Epoetin alfa (100 U) und Tween 20 (0,0005%) bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung.	38
Abb. 6.1.2f:	Epoetin alfa (100 U) und Tween 20 (0,0005%) bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung.	39
Abb. 6.1.3a:	Human-EPO bewirkt eine Dosis-abhängige Abnahme der NADH-Antwort.	40
Abb. 6.1.3b:	Mit zunehmender $Ca^{2+}$ -Konzentration kommt es bei gleichbleibender Human-EPO-Konzentration zu einem Anstieg der NADH-Antwort.	41
Abb. 6.1.3c-h:	Human-EPO und Na-Citrat bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung, die im Vergleich zur Abnahme nach Vorinkubation mit CsA geringer ausfällt.	44
Abb. 6.1.3i-l:	Human-EPO und Na-Citrat bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung. Die NADH-Atmung fällt mit 0,1 mM NADH im Vergleich zu 1 mM NADH niedriger aus.	46
Abb. 6.1.3m+n:	Sowohl Na-Citrat als auch Human-EPO vermindern die maximale NADH-Antwort.	47
Abb. 6.1.4a+b:	ARA 290 hat keinen Effekt auf die NADH-Atmung.	48
Abb. 6.1.5a:	Die verschiedenen Konzentrationen von ARA 290 führen zu keiner wesentlichen Änderung der NADH-Atmung.	50
Abb. 6.1.6a:	Ratten-EPO hat keinen Effekt auf die NADH-Atmung.	51

Abb. 6.2.1a-c:	Human-EPO und Na-Citrat führen bei gleicher $\text{Ca}^{2+}$ -Menge zu einer Zeitverlängerung bis zum Eintritt einer irreversiblen Schwellung.	52
Abb. 6.2.1d-f:	Mit Human-EPO und Na-Citrat sind mehr Einzelgaben von $\text{Ca}^{2+}$ bzw. eine längere Zeitspanne nötig, um eine irreversible Schwellung hervorzurufen.	53
Abb. 6.2.1g:	Bei Human-EPO und Na-Citrat kommt es zu einer deutlichen Verzögerung der irreversiblen Schwellung. Bei CsA zeigt sich eine noch stärkere Verzögerung der irreversiblen Schwellung im Sinne einer maximalen Blockade der PTP.	54
Abb. 6.2.2a+b:	ARA 290 führt nicht zu einer Verzögerung der irreversiblen Schwellung.	54
Abb. 6.3.1a+b:	Bei Zugabe von Glutamat/Malat erhöht sich die Calcium-Retention-Capacity.	55
Abb. 6.3.1c-e:	Nach Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO und 0,4 mM Na-Citrat/1,7 mM NaCl ist im Vergleich zur Kontrolle mehr $\text{Ca}^{2+}$ erforderlich, um einen Zusammenbruch des Membranpotentials zu bewirken.	56
Abb. 6.3.2a+b:	ARA 290 hat keinen Effekt auf das Membranpotential.	57

### 3. Tabellenverzeichnis

Tab. 5.1A	Verwendete Geräte und deren Hersteller	20
Tab. 5.1B	Verwendete Substanzen und deren Hersteller	21
Tab. 5.1C	Verwendete Pharmaka und sonstige Informationen	23
Tab. 5.1D	Lösungen und deren Zusammensetzung	24
Tab. 5.1E	Medien für die Präparation von Rattenlebermitochondrien (Medium A-C) und Rattenhirnmitochondrien (MSE-Medium), Einstellung jeweils auf pH 7,2	24
Tab. 5.1F	Medien für die Inkubation von Rattenleber- und Rattenhirnmitochondrien, Einstellung jeweils auf pH 7,2	25

## 4. Einleitung

### 4.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind ca. 0,5-1  $\mu\text{M}$  große, hoch entwickelte Organellen, die aus 2 Membranen, der inneren und der äußeren Membran und 2 Kompartimenten, dem Intermembranraum und der Matrix bestehen. An der Innenmembran spielen sich im Wesentlichen 3 Vorgänge ab: die  $\text{O}_2$ -abhängige Reoxidation von NADH bzw.  $\text{FADH}_2$  mit Hilfe der Atmungskette, die daran gekoppelte oxidative Phosphorylierung als Konservierung der in der Atmungskette frei werdenden Energie in Form von ATP und der Transitverkehr durch die Transportproteine. In der Matrix finden unter anderem die Oxidation von Pyruvat, die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren sowie der Citratzyklus statt. Eine weitere wesentliche Funktion besteht in der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Mitochondrien nehmen  $\text{Ca}^{2+}$  über den Uniporter in der Innenmembran auf(1). Dieser Prozess ist vom Membranpotential abhängig und kann von Ruthenium Rot inhibiert werden(1). Die normale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt zwischen 100 nM und 1  $\mu\text{M}$ (1), nahe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Zellmembran auch über 40  $\mu\text{M}$ (2), sodass Mitochondrien eine bedeutende Rolle in der Verteilung von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle zukommt. Mitochondrien akkumulieren  $\text{Ca}^{2+}$  ab einer intrazellulären Konzentration von 400 nM(1).

#### 4.1.1 Die verschiedenen „States“ der respiratorischen Aktivität isolierter Mitochondrien

Die mit Hilfe des Sauerstoffverbrauchs gemessene respiratorische Aktivität isolierter Mitochondrien kann in verschiedene „States“ eingeteilt werden. Bei der Definition dieser „States“ orientierten wir uns am Originalartikel von Chance et. Williams(3). Nach diesem werden in „State“ 1 isolierte Mitochondrien einem Respirationsmedium hinzugeben, das Sauerstoff und anorganisches Phosphat ( $\text{P}_i$ ), aber bis auf die endogenen keine Reduktionsäquivalente ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ) oder reduzierten Substrate enthält. Der Sauerstoffverbrauch nimmt nur langsam zu. Bei den „States“ 2 und 3 wichen wir vom Originalartikel von Chance et. Williams ab. Diese definierten „State“ 2 ursprünglich als einen „Steady State“, der nach der Gabe von ADP eintritt, sobald das endogene, undefinierte Substrat aufgebraucht ist (Substrat-limitierender „State“). Die Atmung erreicht einen Nullpunkt. Anschließend erfolgt mit der Gabe von exogenem Substrat ein

definierter Substratverbrauch, der zu „State“ 3 führt. Der Sauerstoffverbrauch steigt deutlich an. Wir orientierten uns bei der Definition der „States“ 2 und 3 an Nicholls und Ferguson in „Bioenergetics“ (1.-4. Ausgabe)(4). Diese definierten „State“ 2 als Atmung in Anwesenheit von exogenem Substrat aber ohne (exogenes) ADP. Hierbei können entweder NADH-generierende Substrate wie Pyruvat, Glutamat und Malat verwendet werden. Die Reaktion von NADH zu NAD<sup>+</sup> wird durch die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I der Atmungskette) katalysiert. Oder es werden dem Komplex II der Atmungskette zugehörige Substrate wie Succinat hinzugeben, welches ein direktes Substrat der Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase ist. Erst jetzt gaben wir ADP hinzu und erreichten einen weiteren Anstieg des Sauerstoffverbrauchs auf das 3-4fache, wobei die maximale Atmungsaktivität erreicht wird („State“ 3). In Übereinstimmung mit o.g. Autoren kommt es nach Phosphorylierung von ADP zu ATP zu einem Absinken der Atmungsaktivität, welches als „State“-4-Atmung bezeichnet wird. In „State“ 5 ist der Sauerstoff vollständig aufgebraucht und der Sauerstoffverbrauch kommt zum Erliegen.

#### 4.1.2 Mitochondrien und Zelltod

Es werden mindestens zwei Formen des Zelltodes unterschieden, zum einen Nekrose zum anderen der programmierte Zelltod, welcher sich in mindestens drei weitere Formen einteilen lässt: die klassische Apoptose, der autophagische Zelltod und der zytoplasmatische Zelltod(5). Verschiedene pathologische Prozesse wie Entzündung, Hypoxie/Ischämie, Intoxikationen, metabolische Störungen oder oxidativer Stress können sowohl zu Apoptose als auch Nekrose führen. Ob eine Zelle Apoptose oder Nekrose begeht, hängt neben der Reizstärke und -dauer v. a. vom energetischen Status (ATP-Konzentration) der Zelle ab.

##### 4.1.2.1 Apoptose

Apoptose ist ein mit Verzögerung auftretender, aktiver, ATP-verbrauchender Prozess, der bei milden pathologischen Reizen auftritt. Sie agiert über 2 Hauptwege: Der Liganden-vermittelte extrinsische Signalweg beinhaltet die Aktivierung von Todesrezeptoren der Plasmamembran, wie TNFR-1, Fas und p75NTR(6) und resultiert

in der Aktivierung von Caspase 8 oder 10(7). Der mitochondriale Signalweg (intrinsischer Signalweg) kann durch viele Stimuli u. a. Ischämie-Hypoxie-Reperfusion, freie Radikale (ROS – *reactive oxygen species*) und Toxine verursacht werden. ROS aktivieren den *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 alpha)(8), welcher u. a. die Transkription von Erythropoetin induziert(9). Auch Caspase 8 kann über die Spaltung von Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) den intrinsischen Signalweg aktivieren(10). Dieser führt bei relativ milder Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und so zu einer Freisetzung proapoptotischer Proteine unter anderem Cytochrom C, *apoptosis inducing factor* (AIF) und Endonuklease G(11). Das freigesetzte Cytochrom C führt zur Aktivierung von Caspase 9. Der apoptotische Zelltod ist gekennzeichnet durch Ablösung der Zelle aus dem Verband, Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung der Zellbestandteile. Am Ende steht der Zerfall der gesamten Zelle in apoptotische Körperchen mit anschließender Phagozytose durch Nachbarzellen und Makrophagen.

Die Neigung einer Zelle Apoptose zu begehen, hängt von dem Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie ab(12). Antiapoptotische Mitglieder (z. B. Bcl-2 und Bcl-xL) können Apoptose unterdrücken, indem sie das mitochondriale Membranpotential erhalten, die Freisetzung proapoptotischer Proteine inhibieren und die Aktivierung von Caspasen kontrollieren(13). Die proapoptotischen Proteine Bax und Bak können supramolekulare Öffnungen in der äußeren Mitochondrienmembran bilden, welches im Fall der Apoptose zu einer Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Proteine in das Cytosol führen könnte, ein Prozess der von Bcl-xL gehemmt wird(14). Die Inhibierung von BAD, eines weiteren proapoptotischen Proteins, spielt außerdem eine wichtige Rolle in der neuroprotektiven Wirkung von Erythropoetin(15). Sowohl die pro- als auch die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie scheinen in der downstream-Signalkaskade von *glycogen synthase kinase 3β* (GSK-3β) von Bedeutung zu sein, wo sie die Empfindlichkeit der *permeability transition pore* (PTP) auf oxidativen Stress regulieren. Die GSK-3β selbst scheint in dieser Beziehung der Punkt zu sein, an dem mehrere protektive Signalwege zusammentreffen. Eine Hemmung der GSK-3β durch Phosphorylierung führt zur Inhibierung der PTP-Öffnung(16). Beide Wege der Apoptose führen schließlich zu einer

Aktivierung der Effektorcaspasen und damit zur Spaltung von Targetproteinen(17).

Apoptose ist bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen (M. Alzheimer(18), M. Parkinson(19)) sowie bei akuten neuronalen Erkrankungen (Trauma(20), zerebrale Krampfanfälle(21), Schaden nach zerebraler Ischämie bzw. Reperfusion(22)) von Bedeutung. Nach fokaler zerebraler Ischämie spielt Apoptose eine Rolle beim Infarktwachstum in der grenzwertig minderdurchbluteten Infarkttrandzone, der Penumbra(23).

#### 4.1.2.2 Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose schließt sich Nekrose unmittelbar an das schädigende Ereignis an, benötigt keine Energie und erfordert starke Reize, um ausgelöst zu werden. Verschiedene pathologische Reize resultieren in einer Abnahme der oxidativen Phosphorylierung, wodurch kein ATP mehr für die Zelle zur Verfügung steht. In der Folge kann es zur intrazellulären Überladung mit  $\text{Ca}^{2+}$  aufgrund verminderter Tätigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen des sarko/endoplasmatischen Retikulums und des Sarkolemmes kommen. Unter diesen Umständen häufen Mitochondrien signifikante Mengen an  $\text{Ca}^{2+}$  an, was zur Einleitung der *mitochondrial permeability transition* (MPT) der Innenmembran(24) und damit zur Nekrose der Zelle führt. Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch mitochondriale Schwellung, Kollaps des Membranpotentials und Spaltung des glycolytisch-produzierten ATP durch die ATP-Synthase.

#### 4.1.3 *mitochondrial permeability transition* (MPT)

Der Begriff *mitochondrial permeability transition* beschreibt die Zunahme der Permeabilität der äußeren und inneren Mitochondrienmembran für Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 1500 KDa. Diese wird vermutlich durch die Öffnung einer Pore in der inneren Mitochondrienmembran, die als *mitochondrial permeability transition pore* (PTP) bezeichnet wird, verursacht. Die Zunahme der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran ist möglicherweise auf den *voltage dependant anion channel* (VDAC) oder auf Reißen durch osmotisches Schwellen der Matrix

zurückzuführen(25). Die Leitfähigkeit der PTP bzw. des mitochondrialen Megachannels (elektrophysiologisches Äquivalents der PTP) lag in Patch-Clamp-Experimenten an Rattenlebermitoplasten bei 1,3 ns (26).

#### 4.1.3.1 Struktur der *permeability transition pore* (PTP)

Die Struktur der PTP ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Das klassische Modell ging davon aus, dass die PTP hauptsächlich aus 3 Komponenten besteht: dem VDAC in der äußeren mitochondrialen Membran (OM – *outer membrane*), der *adenine nucleotid translocase* (ANT) der inneren mitochondrialen Membran (IM – *inner membrane*) sowie dem CsA-bindenden Protein Cyclophilin D (Cyp D) der Matrix(27). Studien mit knockout-Mäusen hingegen zeigten, dass MPT auch in ANT-, VDAC- und Cyp D-defizienten Mitochondrien stattfindet. Die Eigenschaften der MPT ändern sich dabei allerdings(16). So ist in ANT-defizienten Mäusen eine höhere Menge  $\text{Ca}^{2+}$  erforderlich und der ANT-Ligand Atractylosid führt nicht zu einer Öffnung der PTP(28). In Cyp D-defizienten Mäusen ist die Menge an benötigtem  $\text{Ca}^{2+}$  ebenfalls höher und die Öffnung der PTP kann nicht mehr durch Cyclosporin A (CsA) blockiert werden(29) bzw. höhere Mengen an CsA werden benötigt(30). Die Beteiligung weiterer Proteine wie Mitglieder der Bcl-2-Familie(30), Hexokinase und peripherer Benzodiazepin-Rezeptor werden diskutiert(31).

Eine neuere Hypothese geht davon aus, dass die  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP-Synthase bzw. Komplex V der Atmungskette ein zentraler Bestandteil der PTP ist (siehe Abb. 4.1.3.1)(32). Sie setzt sich aus der katalytischen Komponente  $\text{F}_1$ , der membrangebundenen Protonen-transportierenden Komponente  $\text{F}_0$  sowie der lateralen Komponente, welche als Bindeglied zwischen  $\text{F}_1$  und  $\text{F}_0$  fungiert, zusammen. Die  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP-Synthase ist in Form von Dimeren assoziiert, welche in Oligomeren an der inneren Mitochondrienmembran angeordnet sind(33). Die OSCP (*oligomycin sensitivity-conferring protein*)-Untereinheit der  $\text{F}_1$ -Komponente ist die Bindungsstelle für Cyp D(34) und Bz-423, einem Inhibitor der ATP-Synthase(35). Bz-423 erhöht die Empfindlichkeit der PTP für  $\text{Ca}^{2+}$ (34). Die Bindung von Cyp D erfordert  $\text{P}_i$  und führt zu einer partiellen Hemmung der ATP-Synthase(36), gleichzeitig käme es zu einer Konformationsänderung an den Metall-Bindungsstellen, sodass eine geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge notwendig ist, um die MPT auszulösen(32). CsA hingegen verlagert Cyp D und führt zu einer Enzym-



Reaktivierung(36). In Abwesenheit von Cyp D wäre somit eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge nötig, um die PTP zu öffnen(32). Der Kanal für die Transition der Moleküle selbst könnte im Bereich der Schnittstelle zwischen den beiden c-Ringen der  $\text{F}_0$ -Komponente der Dimere liegen(32). Ihre elektrophysiologischen Eigenschaften scheinen denen des mitochondrialen Megachannels, dem elektrophysiologischen Äquivalent der PTP zu entsprechen. Dies folgerten Giorgio et al. nach Inkorporierung von ATP-Synthase-Dimeren in eine Azolectin-Doppelschicht und nachfolgenden Strommessungen. Die Addition von Bz-423 triggerte in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  die Öffnung eines Kanals von hoher Leitfähigkeit, der durch  $\text{Mg}^{2+}/\text{ADP}$  und den ADP-Synthase-Inhibitor AMP-PNP geblockt werden konnte. Seine maximale Leitfähigkeit lag zwischen 1,0 und 1,3 ns(34).

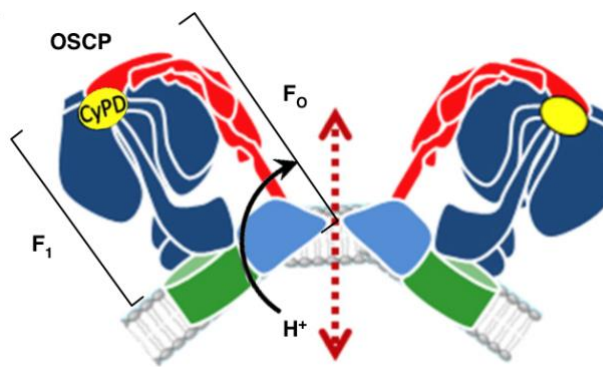


Abb. 4.1.3.1.: Schematisierte Darstellung der  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP Synthase modifiziert nach Bernardi(32) und Baker et al.(37). Die  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP Synthase besteht aus einer wasserlöslichen  $\text{F}_1$ -Untereinheit und einer membrangebundenen  $\text{F}_0$ -Untereinheit, die sich wiederum aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen. OSCP fungiert als Bindungsstelle für Cyp D. Die Transitionsstelle der PTP könnte im Bereich zwischen den beiden  $\text{F}_0$ -Untereinheiten der Dimere liegen.

#### 4.1.3.2 Physiologie und Pathologie der *permeability transition pore*

Die PTP kann sich kurzzeitig oder längerfristig öffnen(38). Kurzzeitige Öffnungen scheinen eine physiologische Rolle zu spielen. So trägt die PTP zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Matrix-pH bei, ist an mitochondrialen Redoxreaktionen beteiligt und dient der schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und dem Austausch von Pyridin-Nukleotiden(39). Lang andauernde Öffnungen hingegen führen zu einem sofortigen Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials mit folgender Verarmung an ATP(40), Elektrolyten und u. a. für die Atmungskettenenzyme erforderlichen Substraten. Durch den Verlust von Pyridin-Nukleotiden und Cytochrom c kommt es zu einer Inhibierung der Atmungskette(31, 41) mit resultierender Steigerung der ROS-Produktion(42). Der Verlust von Cytochrom c aus dem Membranspalt könnte sich durch die Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran aufgrund der PTP-bedingten Schwellung des Mitochondriums erklären. Die PTP scheint eine große Rolle bei Ischämien zu spielen, z. B. bei Herzinfarkt und Schlaganfall(43). Dabei ist insbesondere von Bedeutung, dass die

PTP während der Ischämie geschlossen bleibt und sich erst während der Reperfusion öffnet(44). Bei geringer MPT kann sich die Zelle erholen, bei moderater MPT begeht die Zelle Apoptose; bei starker MPT kommt es zur Nekrose(43).

#### 4.1.3.3 Modulation der *permeability transition pore*

Die PTP kann durch verschiedene Modulatoren beeinflusst werden. Der wichtigste Modulator ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Matrix(40).  $\text{Ca}^{2+}$  gelangt hierbei problemlos über die OM und durch den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter(45) und den  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter(46) über die IM. Erhöhte Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$  führen zur Öffnung der PTP(40). Die genau benötigte Konzentration ist von verschiedenen Faktoren wie der Konzentration von anorganischem Phosphat ( $\text{P}_i$ ) und dem pH-Wert abhängig. Möglicherweise wird die Empfindlichkeit der PTP-Öffnung nicht nur direkt durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sondern auch indirekt durch zelluläre Antworten auf die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesteuert, wie z. B. die Akkumulation von ROS(47).

Auch  $\text{P}_i$  kann über verschiedene Mechanismen zur Öffnung der PTP führen(48). Es bindet Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{H}^+$  und trägt so als physiologischer Puffer zum pH-Wert bei, der für die PTP-Öffnung relevant ist(49). Dieser liegt bei 7,3. Auf diese Weise antagonisiert  $\text{P}_i$  eine im Rahmen einer Ischämie ohne Reperfusion auftretende Azidose, die selbst als PTP-Inhibitor fungiert(31). Über Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$ , das seinerseits ein PTP-Inhibitor ist(50), kommt es zu einer Senkung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration und damit zur PTP-Öffnung. Außerdem kann aus  $\text{P}_i$  Polyphosphat generiert werden, ebenso ein PTP-Induktor(51). Auf der anderen Seite führt eine Erhöhung der  $\text{P}_i$ -Konzentration in der Matrix zu einer Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und damit zu einer PTP-Blockade, gleichzeitig aber zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Matrix(48) und damit wiederum zu einer PTP-Öffnung. Eine ursprüngliche Theorie, nach der  $\text{P}_i$  in Anwesenheit von CsA bzw. Abwesenheit von Cyp D über eine inhibitorische Wirkung auf die PTP(52) verfügt, konnte durch Varanyuwatana und Halestrap widerlegt werden. Demnach aktiviert  $\text{P}_i$  die PTP unabhängig vom Energiezustand des Mitochondriums (soweit getestet)(53).

Ein weiterer Trigger der PTP-Öffnung ist die mitochondriale Depolarisation insbesondere in Zusammenhang mit oxidativem Stress(54, 55). Bedeutend ist nicht nur

der elektrochemische Gradient sondern auch das Oberflächenpotential an der inneren mitochondrialen Membran(39).

Es existieren verschiedene pharmakologische Inhibitoren der PTP, die in Zukunft als Basis eine Rolle bei der Behandlung vieler durch Apoptose bedingter Krankheitsbilder, z. B. der durch Ischämie – Reperfusion bedingten Apoptose, spielen könnten. Unter ihnen ist das bereits genannte Immunsuppressivum Cyclosporin A(56), das Tetrazyklin Minocyclin(57, 58), das von der Epiphyse produzierte Hormon Melatonin(59) und die Dopaminagonisten Pramipexol(60) und Ropinirol(61).

## 4.2 Erythropoetin

### 4.2.1 Das erythropoetische Erythropoetin

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoprotein-Hormon, welches aus 165 Aminosäuren besteht und eine molekulare Masse von 30.4 kDa aufweist(62). Es besteht aus 4 alpha-Helices, welche über hydrophobe Interaktionen zu einem kompakten globulären Molekül assoziiert sind. Das renale EPO wird beim Erwachsenen als Antwort auf Hypoxie im tubulären Interstitium der Niere produziert. Als Folge der Hypoxie kommt es zu einer Stabilisierung des *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 alpha) und infolgedessen zu einer Transkription des EPO-Gens. Die normale EPO-Konzentration im Plasma beträgt ca. 20 mU/ml (1-10 pmol/l). Bei schwerer chronischer Hypoxie kann die Plasmakonzentration von EPO bis zu 100fach ansteigen(63).

Innerhalb des Knochenmarks bindet EPO mit hoher Affinität im Verhältnis 1:2 (EPO:EPOR) an einen EPO-Rezeptor (EPOR<sub>2</sub>), welcher als praeformiertes Homodimer auf EPO-responsiven Zellen existiert(64). Die Bindung an den EPOR<sub>2</sub> wird hierbei über Anteile der Helices A und C (*site 2*) sowie Helix D und die Helix A und B verbindende Schleife (*site 1*) vermittelt(65). Nach Aktivierung des EPOR<sub>2</sub> kommt es zu einer Konformationsänderung und schließlich einer Signaltransduktion über Januskinase 2 (JAK-2), *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT 5), *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)(66) und Proteinkinase C(67). Hierdurch kommt es zu einer Blockade der Apoptose(68), zu einer Stimulierung der

Proliferation(69) und Differenzierung der sensitiven erythroiden Vorläuferzellen. Die geringe Zeitspanne, in der der EPOR<sub>2</sub> auf den meisten erythroiden Vorläuferzellen exprimiert wird, sowie die mit ca. 3% niedrige Bindungsdichte des EPOR<sub>2</sub> bei normaler EPO-Konzentration machen eine kontinuierliche Expression von EPO, eine lange Plasma-Halbwertszeit und eine hohe Affinität (100-200 pmol/l) des EPO an den EPOR<sub>2</sub> erforderlich, um eine kontinuierliche Produktion von Erythrozyten zu gewährleisten(70). Aufgrund der ebenfalls über den EPOR<sub>2</sub> vermittelten Stimulierung der Thrombozytenfunktion sowie Erhöhung der E- und P-Selectin-Expression, besteht außerdem eine thrombogene Wirkung(71).

Rekombinantes humanes Erythropoetin (Epoetin alfa, Epoetin beta, Epoetin theta, Epoetin zeta, Darbepoetin alfa) wird klassischerweise zur Behandlung der symptomatischen Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz bei Erwachsenen und Kindern bzw. Jugendlichen im Alter von 1 bis 18 Jahren angewendet. Außerdem wird es unter bestehender Chemotherapie zur Behandlung der Anämie und Reduktion des Transfusionsbedarfs bei Patienten mit soliden Tumoren, malignem Lymphom oder multiplem Myelom eingesetzt. Eine weitere Anwendung findet es bei Erwachsenen im Rahmen eines Eigenblut-Spendeprogramms zur Steigerung der autologen Blutgewinnung vor größeren elektiven operativen Eingriffen mit zu erwartendem großen Blutverlust bzw. zur Reduktion des Bedarfs an Fremdbluttransfusionen vor großen elektiven orthopädischen Eingriffen. Die Indikation der einzelnen Wirkstoffe ist nicht deckungsgleich. Epoetin beta ist als einziges Erythropoetin zur Vorbeugung einer Frühgeborenen-Anämie bei Kindern, die vor der 34. Schwangerschaftswoche geboren wurden, indiziert. Die Initialdosis zur Behandlung einer Anämie bei erwachsenen Hämodialysepatienten liegt bei 50 U/kg Körpergewicht dreimal wöchentlich und wird an den gewünschten Zielbereich der Hämoglobinkonzentration angepasst (laut Fachinformation der einzelnen Hersteller der in Deutschland vermarkteten Produkte, Epoetin alfa: Medice, Janssen-Cilag; Epoetin beta: Roche; Epoetin theta: TEVA; Epoetin zeta: Pfizer Pharma PFE; Darbepoetin alfa: Amgen).

#### 4.2.2 Das gewebeprotective Erythropoetin

Im Vergleich zur hormonellen erythropoetischen Aktivität wird EPO als Teil des angeborenen Immunsystems auch von vielen anderen Geweben produziert und

ausgeschüttet, wenn sich diese im Rahmen einer Infektion/Inflammation, einer Ischämie oder eines Traumas im Zustand einer Hypoxie oder in metabolischem Stress befinden. Dieses gewebeprotective Erythropoetin ist vermutlich wie das im Gehirn synthetisierte EPO weniger sialysiert, dadurch kleiner und besitzt eine deutlich geringere Plasma-Halbwertszeit(72). Es wird als Teil eines autokrinen-parakrinen Systems angesehen, das Gewebeprotektion vermittelt, indem es Apoptose verhindert und die Aktivität proinflammatorischer Zytokine hemmt(73). Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der an die zentrale Gewebeschädigung angrenzenden Region (Penumbra - *area at risk*) zu. Proinflammatorische Zytokine der Penumbra (z. B. TNF-alpha) stimulieren die Expression von spezifischen gewebeprotectiven EPO-Rezeptoren (IRR – *innate repair receptor*), supprimieren aber gleichzeitig die EPO-Produktion(74). Es existiert eine erhebliche Zeitverzögerung zwischen der Expression von EPO (1-7 Tage) und der des IRR (8-12 h)(75), sodass ein erhöhtes Risiko für die Zerstörung der Penumbra besteht. Gleichmaßen ergibt sich hieraus eine neue Einsatzmöglichkeit für exogen verabreichtes EPO.

Lokal produziertes EPO wirkt jedoch nicht nur antiinflammatorisch, sondern spielt auch eine bedeutende Rolle in regenerativen Prozessen. Dies beinhaltet u. a. die Rekrutierung von vaskulären und gewebespezifischen Stammzellen(74) und die Förderung der Wundheilung(76). Ebenso wird der IRR nicht nur von Zellen exprimiert, die metabolischem Stress ausgeliefert sind, sondern auch von Gewebsmakrophagen(77), Endothelzellen(78) und den Zellen des Hippocampus. In letzterem wird über den IRR sowohl das Lernvermögen als auch die assoziierte hippocampale Neurogenese gefördert(79).

Das von Brines et al. vorgeschlagene Modell des gewebeprotectiven Rezeptors (IRR) besteht aus einem  $\beta$ cR ( *$\beta$  common receptor*), welcher als verflochtenes antiparalleles Dimer über eine Disulphid-Bindung mit je einem EPOR verbunden ist(80). Die Affinität dieses Rezeptors ist niedriger (1-20 nmol/l(73)), daher werden höhere EPO-Dosen benötigt, um einen gewebeprotectiven Effekt zu erzielen (minimal 500 U/kg KG in Schlaganfallmodellen für Nagetiere). Die notwendige Expositionszeit ist deutlich kürzer. Die Bindung eines gewebeprotectiven Moleküls führt meist zu einer Phosphorylierung von JAK-2 innerhalb des zytoplasmatischen Teils des  $\beta$ cR(81), was je nach Zelltyp, Zeitpunkt der Administration und Schadensmuster multiple Signalkaskaden in Gang

setzt. Bislang wurden (vereinfacht) drei Hauptsignalwege identifiziert (siehe Abb. 4.2.2). Der erste Signaltransduktionsweg führt über eine Phosphorylierung des STAT-Proteins u. a. zu einer Synthese des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL(82). Außerdem werden regenerative Prozesse wie die Differenzierung neuraler Stammzellen und die Aussprossung von Neuriten in die Wege geleitet(83). Der zweite Signaltransduktionsweg veranlasst eine Aktivierung der PI3K und anschließend von Akt (Protein Kinase B - PKB)(84). Akt aktiviert in Endothelzellen die endotheliale Nitritoxidsynthase (eNOS), was über die Bildung von Nitritoxid zur Vasodilatation und Rekrutierung von endothelialen Stammzellen führt(85). Der dritte Signaltransduktionsweg beinhaltet die MAPK(86). Sowohl PI3K/Akt als auch MAPK inhibieren die GSK-3 $\beta$ , was zu einer direkten Hemmung der mitochondrialen PTP und somit zur Verhinderung der Apoptose führt(87). Außerdem spielt GSK-3 $\beta$  eine bedeutende Rolle in der Regulierung von NF $\kappa$ B(88), einem kritischen Modulator der Entzündung.

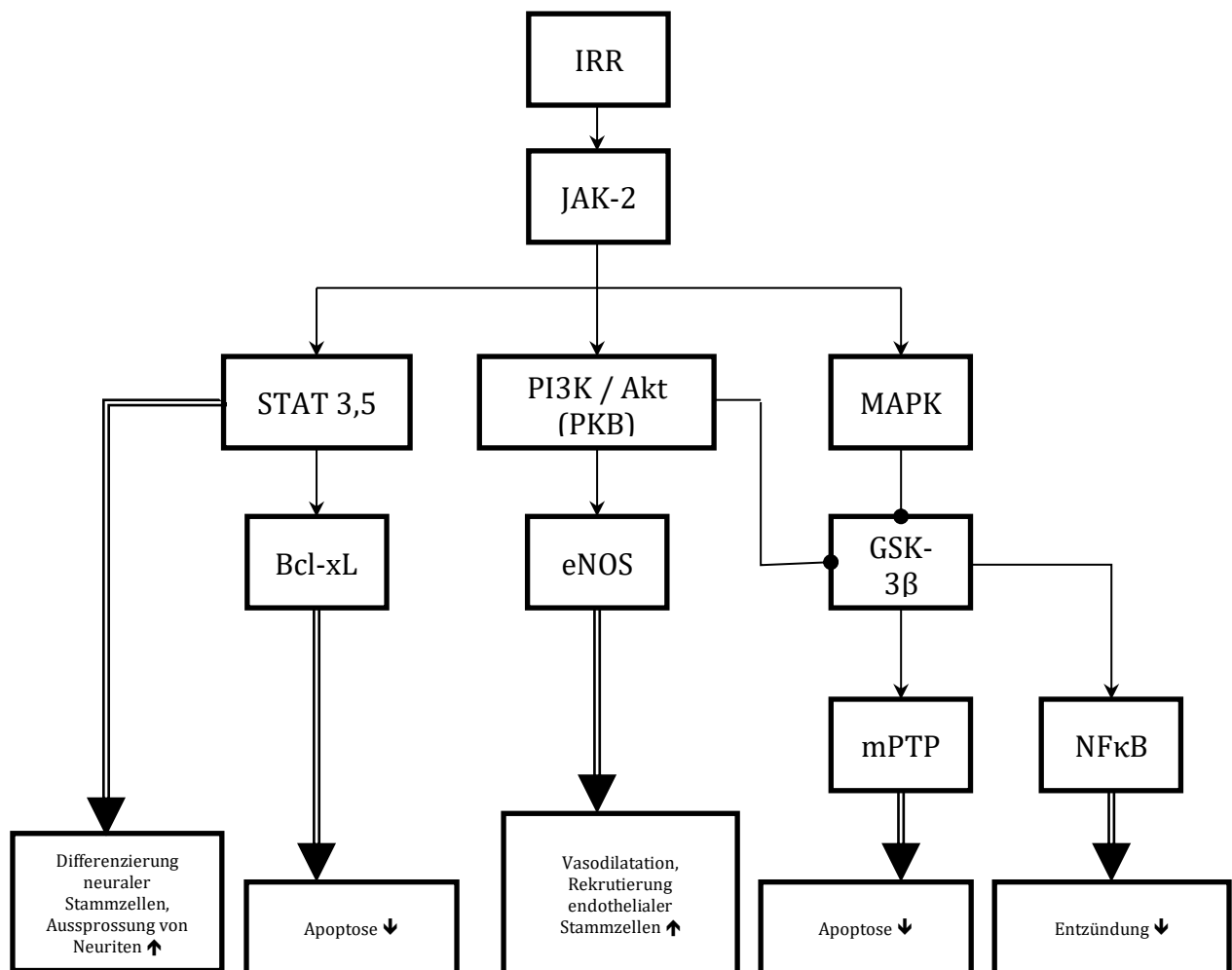


Abb. 4.2.2: **Signaltransduktionswege und Effekte des IRR**, modifiziert nach M. Brines, A. Cerami 2012(89). Erythropoetin und dessen gewebeprotective Derivate aktivieren über den IRR je nach Gewebetyp spezifische Signaltransduktionswege, zumeist beginnend mit einer Phosphorylierung der JAK 2. Die sich anschließenden Signaltransduktionswege beinhalten STAT 3,5, PI3K / Akt (PKB) und MAPK, die regenerative und anti-apoptotische Prozesse in Gang setzen.

Der neuroprotektive Effekt von peripher verabreichtem Erythropoetin konnte in einer Vielzahl von Tiermodellen bewiesen werden. So führte in einem Rattenmodell der Okklusion der A. cerebialis media und der ipsilateralen und contralateralen A. carotis interna die intraperitoneale Administration von 5000 U/kg Körpergewicht rekombinantem EPO zu einer 75%igen Reduktion der Apoptose innerhalb der Penumbra, einhergehend mit einem reduzierten Einstrom von Entzündungszellen und proinflammatorischen Zytokinen(90). Das Alter der Tiere scheint eine kritische Rolle zu spielen. So profitierten in einer anderen Studie 5 Monate alte Mäuse von der Therapie mit EPO, 20 Monate alte Mäuse hingegen nicht(91). Eine kleine *proof-of-concept* humane Schlaganfall-Studie konnte ebenso einen signifikanten Effekt von rekombinantem EPO zeigen(92). Der groß angelegte „German Multicenter EPO Stroke Trial“, der die oben genannten Ergebnisse reproduzieren sollte, zeigte hingegen eine erhöhte Mortalität bei Patienten, die mit Epoetin alfa und rtPA (*recombinant tissue plasminogen activator*) behandelt wurden(93, 94). Eine andere Studie stellte klinisch relevante Thrombosen als Nebenwirkung fest(95). Klinische Studien an Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigten bislang keinen Vorteil durch die Behandlung mit EPO-Analoga(96). Studien an Ratten konnten trotz fehlendem Schutz vor kardialer Dilatation und Dysfunktion einen positiven Effekt auf den Kollagenumbau nach akutem Myokardinfarkt belegen(97).

#### 4.2.3 Entwicklung nicht-erythropoetischer, gewebeprotektiver EPO-Derivate

Um die hämatopoetische und vaskuläre Aktivität und damit einhergehende starke koagulatorische und hämodynamische Wirkung von EPO zu umgehen, wurden, mit dem Ziel, eine Bindung an den hämatopoetischen EPOR<sub>2</sub> zu verhindern, verschiedene Modifikationen am EPO-Molekül durchgeführt. Mit der Desialinisierung des EPO-Moleküls wurde eine drastische Verkürzung der Halbwertszeit von ca. 6 Stunden auf nur einige Minuten erreicht. Das entstandene AsialoEPO war *in vivo* nicht erythropoetisch(98), behielt aber seine gewebeprotektive Wirkung bei (99). Eine weitere Modifikation des EPO-Moleküls besteht in der Carbamylierung der für die Bindung an den EPOR<sub>2</sub> benötigten Bindungsstellen 1 und 2 mit der positiv geladenen Aminosäure Lysin. Das nun neutral geladene carbamylierte EPO-Molekül (CEPO) besitzt keine Affinität für den EPOR<sub>2</sub>(100) und damit keine hämatopoetischen(101), koagulatorischen, angiogenetischen oder vasoaktiven Eigenschaften(102). Seine

umfassende gewebeprotective Wirkung konnte in multiplen präklinischen Studien bewiesen werden(100).

Eine weitere Modifikation ist das Helix B-Peptid (Helix B *surface peptide*) ARA 290. Dieses wurde als lineare Sequenz der 11 zum wässrigen Medium zeigenden Aminosäuren der Helix B des EPO-Moleküls synthetisiert (siehe Abb. 5.2.3.1). Es hat somit keine Ähnlichkeit mehr mit der Primärsequenz von EPO, spiegelt aber die dreidimensionale äußere Struktur wieder. ARA 290 hat eine kurze Halbwertszeit von ca. 2 Minuten und einen schnellen Effekt auf die Genexpression(103). Es zeigte neuroprotective Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo*(104). Die Gewebeprotektion konnte u. a. in Tiermodellen von Verletzungen des N. ischiadicus, Ischämie der A. cerebralis media, renaler Ischämie-Reperfusion-Verletzung und Wundheilung nachgewiesen werden. Eine erythropoetische Wirkung bestand nicht(104). Erste Studien an Patienten mit Sarkoidose und small fiber neuropathy zeigten eine Reduktion neuropathischer Symptome in Verbindung mit einem Anstieg kleiner Nervenfasern(105). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass ARA 290 die metabolischen Marker HbA<sub>1c</sub> und HDL reduzierte und neuropathische Symptome von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 verbesserte(106).

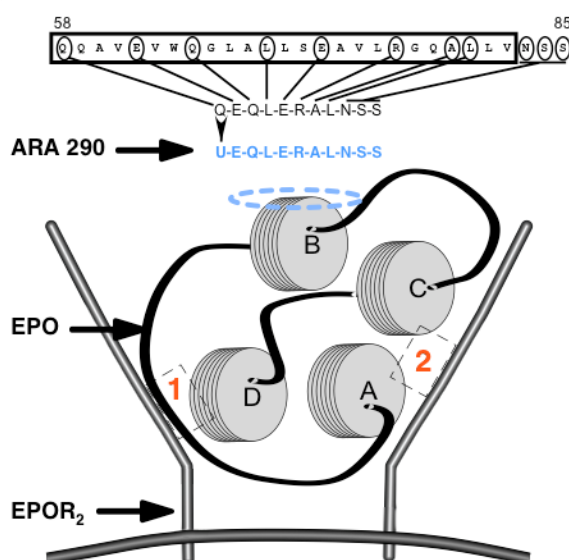


Abb. 4.2.3.1: Schematisierte Darstellung von EPO und dessen Bindung an den EPOR<sub>2</sub> sowie von ARA 290 modifiziert nach M. Brines et al.(104). Erythropoetin bindet über 2 Bindungsstellen (*site 1* und *2*) an seinen homodimerischen hämatopoetischen Rezeptor (EPOR<sub>2</sub>). Dabei sind Teile der Helices A, C und D involviert. Helix B hingegen zeigt vom EPOR<sub>2</sub> weg und vermittelt stattdessen die gewebeprotective Wirkung über den IRR. 11 der sich an der Oberfläche von Helix B befindlichen Aminosäuren bilden als lineares Peptid synthetisiert das gewebeprotective Peptid ARA 290.



### 4.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Erythropoetin wurde indirekt mit einer Hemmung der PTP über eine Blockade der GSK-3 $\beta$  in Verbindung gebracht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob neben der indirekten Wirkung über den EPOR<sub>2</sub> bzw. *innate repair receptor* auch ein direkter Effekt von Erythropoetin über eine Bindungsstelle an der PTP nachzuweisen ist. Hierzu bedienten wir uns drei verschiedener Methoden: der Sauerstoffverbrauchsmessung, der Schwellungsmessung und der Membranpotentialmessung.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

Im Folgenden sind die verwendeten Geräte und Substanzen (inklusive Pharmaka) sowie Lösungen und Medien aufgelistet.

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Sartorius Basic AG	Sartorius, Göttingen
Cary 100 UV-Vis Spektralphotometer	Varian Inc., USA
Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektralphotometer	Varian Inc., USA
Dounce-Glashomogenisator (2 ml)	Sigma, Steinheim
Mikroliter-Spritzen	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
OROBOROS Oxygraph	Anton Paar KG, Österreich
Ph-Elektrode Portamess 751	Knick, Berlin
Teflon-Homogenisator (55 ml)	Wheaton, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vibrofix VF1	IKA, Staufen
Vortexer	Scientific Industries, USA
Wasserbad Thermomix	B. Braun, Melsungen
Zentrifuge Sorvall RC-5B Plus	Kendro Laboratory Products, USA

**Tab. 5.1A Verwendete Geräte und deren Hersteller**

Substanzen	Hersteller
CaCl <sub>2</sub>	Sigma, Steinheim
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim
Digitonin	Sigma, Steinheim
EGTA	Sigma, Steinheim
Ethanol 98%	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Steinheim
K-Na-Tartrat x 4 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
KOH	Merck, Darmstadt
L-Glutamat	Sigma, Steinheim
L-Malat	Sigma, Steinheim
Mannit	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma, Steinheim
Na-Citrat	Sigma, Steinheim
Na-Desoxycholat	Sigma, Steinheim
Na-Dithionit	Fluka, Schweiz
Na-EDTA	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Na <sub>3</sub> -ADP	Sigma, Steinheim
NaCl	Merck, Darmstadt
NADH	Roche, Mannheim
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Polysorbat 20	Sigma, Steinheim
Proteinstandard (20 g/dl)	Sigma, Steinheim
Pyruvat	Sigma, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Safranin O	Sigma, Steinheim
Succinat	Sigma, Steinheim
Tris	Sigma, Steinheim

**Tab. 5.1B Verwendete Substanzen und deren Hersteller**

Pharmaka	Sonstige Informationen
<b>Erypo® (Epoetin alfa),</b> 2000 IE (= U)/0,5 ml, Janssen-Cilag, Belgien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rekombinante Variante des natürlichen Erythropoetins</li> <li>• hergestellt aus einem genetisch modifizierten Subklon einer Ovarialzelllinie des Chinesischen Streifenhamsters (CHO - <i>chinese hamster ovary</i>)</li> <li>• weist im Vergleich zum natürlichen humanen Erythropoetin Unterschiede in der Zusammensetzung der Glykosylierungsmuster auf(107)</li> <li>• sonstige Bestandteile: Polysorbat 80 (0,03%), Glycin, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, (die letzten drei weniger als 1 mM), H<sub>2</sub>O</li> <li>• verdünnt mit H<sub>2</sub>O</li> </ul>
<b>Erythropoetin, human,</b> 10 U (100 000 U/mg Protein), Sigma, Steinheim	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rekombinant, exprimiert in CHO-Zellen</li> <li>• lyophilisiertes Pulver</li> <li>• Sonstige Bestandteile: 40 mM Na-Citrat, 170 mM NaCl</li> <li>• verdünnt mit H<sub>2</sub>O</li> </ul>
<b>Erythropoetin, Ratte,</b> 18,5 kDa Sigma, Steinheim	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rekombinant, exprimiert in Insektenzellen</li> <li>• lyophilisiertes Pulver</li> <li>• Sonstige Bestandteile: 0,5 mg Rinderserumalbumin</li> <li>• verdünnt mit H<sub>2</sub>O</li> </ul>
<b>ARA 290® (Helix B surface peptide = HBSP),</b> Araim Pharmaceuticals, USA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lineare Sequenz der Helix B des natürlichen Erythropoetin-Moleküls</li> <li>• keine Angabe zu molarer Masse oder sonstigen Bestandteilen</li> <li>• von uns gelöst in DPBS</li> </ul>
<b>Cyclosporin A, &gt; 98,5%,</b> Sigma, Steinheim	<ul style="list-style-type: none"> <li>• von uns gelöst in 0,1 bzw. 1% Ethanol</li> </ul>
<b>Alamethicin, &gt; 98%,</b> Sigma, Steinheim	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptidantibiotikum</li> <li>• isoliert aus dem Kulturfiltrat des Pilzes <i>Trichoderma viride</i></li> <li>• kann durch Aggregation der Peptidstrukturen zu Poren einen fluktuierenden, spannungsabhängigen Ionenfluss in Lipidmembranen erzeugen(108)</li> </ul>

Pharmaka	Sonstige Informationen
<b>Amytal (5-Ethyl-5-isopentylbarbitursäure),</b> 1,0 mg/ml, Sigma, Steinheim	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inhibiert die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I der Atmungskette), indem es den Elektronenfluss von NADH zu Ubichinon blockiert(109)</li> <li>• gelöst in Methanol</li> </ul>
<b>Natriumazid, &gt; 99%,</b> Sigma, Steinheim	<ul style="list-style-type: none"> <li>• blockiert die Cytochrom c:O<sub>2</sub>-Oxidoreduktase (Komplex IV der Atmungskette) irreversibel, indem es an Metallbindungsstellen bindet, an denen die O<sub>2</sub>-Reduktion stattfindet(110)</li> </ul>

Tab. 5.1C Verwendete Pharmaka und sonstige Infomationen

Lösungen	Zusammensetzung
Biuret-Reagenz	K-Na-Tartrat x 4 H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O gelöst, pH mit 1M NaOH
Desoxycholatlösung 3% (pH = 7,4*)	in H <sub>2</sub> O gelöst
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung 1%	200 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM HEPES in H <sub>2</sub> O gelöst
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (pH = 7,2*)	in H <sub>2</sub> O gelöst
L-Malat-Lösung	1 M L-Malat 5 M KOH mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt
L-Glutamat-Lösung	1 M L-Glutamat 5 M KOH mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt
Na <sub>3</sub> -ADP-Lösung	500 mM Na <sub>3</sub> -ADP 1 M NAOH in H <sub>2</sub> O gelöst
NADH-Lösung	150 mM NADH bzw. 15 mM NADH NaHCO <sub>3</sub> 1%

Lösungen	Zusammensetzung
DPBS	1,37 mM NaCl 2,7 mM KCl 12 mM Phosphat (bestehend aus $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ und $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in $\text{H}_2\text{O}$ gelöst

**Tab. 5.1D Lösungen und deren Zusammensetzung**

Medien	Zusammensetzung
Medium A	0,25 M Saccharose 1mM EDTA in $\text{H}_2\text{O}$ gelöst
Medium B	0,25 M Saccharose in $\text{H}_2\text{O}$ gelöst
Medium C	0,25 M Saccharose 0,5 mM EDTA in $\text{H}_2\text{O}$ gelöst
MSE-Medium	0,225 mM D-Mannit 75 mM Saccharose 1mM EGTA 5mM HEPES in $\text{H}_2\text{O}$ gelöst

**Tab. 5.1E Medien für die Präparation von Rattenlebermitochondrien (Medium A-C) und Rattenhirnmitochondrien (MSE-Medium), Einstellung jeweils auf pH 7,2\***

Medien	Zusammensetzung
Hansson-Medien	125 mM KCl 20 mM Tris 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 µM EGTA 1 mM PO <sub>4</sub> (700 µM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 300 µM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) in H <sub>2</sub> O gelöst
Saccharose-Medium	200 mM Saccharose 10 mM Tris 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 µM EGTA in H <sub>2</sub> O gelöst

**Tab. 5.1F Medien für die Inkubation von Rattenleber- und Rattenhirnmitochondrien, Einstellung jeweils auf pH 7,2\***

**\*Anmerkung:** Die Lösungen hatten einen pH-Wert von 7,2, der intrazellulär als physiologisch angesehen wird. In einigen frühen Experimenten wurde noch mit pH 7,4 gearbeitet. Für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen ergab sich kein relevanter Unterschied.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Präparation von Mitochondrien aus Rattenleber (RLM)

Männliche Ratten im Alter von 7 bis 10 Wochen wurden dekapitiert und die Leber entnommen. Sie wurde gesäubert und mehrfach in Medium B gewaschen. Mit einer Schere wurde das Gewebe zerkleinert, mit 50 ml Medium B aufgefüllt und in einem Teflon-Homogenisator, der über eine Bohrmaschine angetrieben wurde, mit 6 bis 8 Hüben homogenisiert. Es folgten 4 Zentrifugationen, jeweils bei 1-5 °C. Das Homogenisat wurde für 5 min bei 800 g (bei der verwendeten Sorvall-Zentrifuge: 2587 rpm) zentrifugiert, der Überstand durch eine 4-lagige Mullbinde gegossen, um die an der Oberfläche schwimmende Fettschicht abzufiltern und anschließend für 4 min bei 5100 g (6532 rpm) zentrifugiert. Das sich bildende Pellet wurde in 2 ml Medium B aufgenommen und nochmals per Hand mit einem kleinen Dounce-Glashomogenisator (2 ml, tight) homogenisiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 12300 g (10144 rpm). Das Pellet wurde in 2 ml Medium B resuspendiert und erneut für 10

Minuten bei 12300 g (10144 rpm) zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 2 ml Medium C aufgenommen und bis zu 6 h auf Eis gelagert.

### 5.2.2 Präparation von Mitochondrien aus Rattenhirn (RHM)

Männliche Ratten im Alter von 7 bis 10 Wochen wurden dekapitiert und das Gehirn entnommen. Die Meningen mit den Blutgefäßen wurden entfernt und das Gehirn (ohne Hippokampus) in MSE-Medium gewaschen und mit der Schere zerkleinert. Es erfolgte die Suspension des zerkleinerten Gehirns in 10 ml MSE-Medium, 0,1% RSA (Rinderserumalbumin) und 10 mg Protease Typ 1 und anschließend die Homogenisierung mit dem großen Teflon-Homogenisator. Danach wurde nochmals mit 20 ml MSE-Medium und 0,1% Rinderserumalbumin verdünnt. Es folgten 3 Zentrifugationen, die jeweils bei 1-5 °C durchgeführt wurden, zunächst für 3 Minuten bei 2000 g (4450 rpm). Der Überstand wurde für 8 min bei 12000 g (10911 rpm) zentrifugiert, das sich absetzende Pellet in 10 ml MSE-Medium und mit 6 mg Digitonin resuspendiert und anschließend mit dem Dounce-Homogenisator weiter zerkleinert. Die entstandene Suspension wurde für 10 Minuten in der Zentrifuge inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 12000 g (10911 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml MSE-Medium resuspendiert und bis zu 6 h auf Eis aufbewahrt.

### 5.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Schnelltest nach Biuret. Dazu wurden jeweils ein Leerwert, 3 Proben und zur Kalibrierung des Testes 3 Standards angefertigt. Alle Lösungen enthielten 250 µl Desoxycholatlösung 3% sowie 750 µl Biuret-Reagenz. Der Leerwert (proteinfreie Lösung) wurde mit 500 µl H<sub>2</sub>O und die Proben mit 490 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl Mitochondriensuspension aufgefüllt. Die Standards enthielten 5 µl Proteinstandard (1 mg Rinderserumalbumin pro 5 µl) in 495 µl H<sub>2</sub>O (entsprechend 1 mg Protein auf 500 µl H<sub>2</sub>O). Die angefertigten Suspensionen wurden in einen Thermomixer gestellt und für vier Minuten bei 95-99 °C durchmischt. Bei einer Wellenlänge von 540 nm erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung der Absorption mit dem Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektralphotometer. Aus Extinktion von Standard und Probe konnte mit Gleichung 1 die Konzentration der Mitochondriensuspension ausgerechnet werden:



1 mg Standard x Extinktion der Probe

----- = mg Probe x 10 µl Mitochondriensuspension (Gleichung 1)

Extinktion des Standards

#### 5.2.4 Schwellungsmessungen

Die Schwellungsmessungen wurden am Cary 100 UV-Vis Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt. Grundlage hierfür ist der kolloid-osmotische Gradient über der inneren Mitochondrienmembran. Wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  die PTP geöffnet, kommt es entlang des kolloid-osmotischen Gradienten zu einem Einstrom von  $\text{H}_2\text{O}$  in das Mitochondrium, welches zu einem Anschwellen des Mitochondriums führt. Dies resultiert in einer Abnahme der im Photometer gemessenen Absorption und ist zumindest teilweise durch den Tyndall-Effekt erklärbar(111).

Die Schwellungsexperimente erfolgten nur an Rattenlebermitochondrien. Es wurde eine Konzentration von ca. 0,5 mg Protein auf 1 ml Medium eingesetzt. Aufgrund von Schwankungen der Mitochondrienqualität wurde die Mitochondrienmenge so variiert, dass zu Beginn der Experimente eine Absorption von 1,5-2 erreicht wurde. An einem Experimentiertag wurde immer die gleiche Mitochondrienmenge verwendet. Als Medium wurde Hansson-Medium verwendet, das zu Beginn sowohl 10 µM Glutamat und 5 µM Malat als Substrate als auch die zu überprüfenden Pharmaka enthielt. Die angegebenen Konzentrationen (Endkonzentrationen) beziehen sich auf die Konzentrationen in der Küvette bzw. Kammer (bei den Sauerstoffverbrauchsmessungen), in die die jeweiligen Substanzen gegeben werden und nicht auf die Konzentration der Stammlösung, aus der sie entnommen werden. Die Menge des Mediums wurde so berechnet, dass bei Zugabe aller weiteren Substanzen ein Gesamtvolumen von ca. 1 ml (2% Abweichung) in der Küvette vorhanden war. Zu Beginn einer Messung wurde jeweils 2 Minuten gewartet, bis eine stabile Anfangsabsorption erreicht wurde. Anschließend wurde 3-6 Mal je 10 µM bzw. 50 µM  $\text{Ca}^{2+}$  im Abstand von 2 min zugesetzt, wodurch die Permeabilitätstransition induziert wurde und sich die Absorption entsprechend verminderte. Kontrollexperimente ohne zu testende Substanz erfolgten jeweils vor und nach Beginn der eigentlichen Messungen. Als Fehlerquelle sei erwähnt, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Resistenz zwischen den einzelnen

Messtagen, zeitweise auch am selben Tag, deutlich schwankte, was sich in einer hohen Standardabweichung ausdrückt. Ausgewertet wurde die Zeit, nach der eine irreversible Schwellung auftrat. Hierzu wurden manuell 2 Geraden gelegt, eine am Wendepunkt der Kurve und eine in den späten Teil der Kurve. Durch deren Kreuzungspunkt wurde eine Senkrechte zur x-Achse geführt und dort die Zeit abgelesen.

#### 5.2.5 Membranpotentialmessungen

Die Membranpotentialmessungen wurden mit Hilfe des kationischen Farbstoffs Safranin O am Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektralphotometer bei einer Anregungsstrahlung von 525 nm und einer Emissionswellenlänge von 587 nm durchgeführt. Grundlage ist der elektrochemische Gradient über der inneren Mitochondrienmembran, dessen Hauptkomponente das Membranpotential darstellt. Aufgrund des negativen Membranpotentials akkumuliert das kationische Safranin O in den Mitochondrien und verteilt sich entsprechend des elektrochemischen Gleichgewichts. Ein Teil des Safranins bindet an anionische Bindungsstellen der inneren Mitochondrienmembran. Die spektroskopisch messbaren Veränderungen der Absorption und der Fluoreszenz beruhen auf einem Wechsel des Safranins an diesen anionischen Bindungsstellen von der monomeren in die dimerische (oder multimerische) Form. Hierbei kommt es zu einer Abnahme der Absorption und der Fluoreszenz(112).

Für die hier durchgeführten Experimente wurden 0,5 mg Protein (Rattenlebermitochondrien) in Hansson- oder Saccharose-Medium mit 5 µl Safranin O suspendiert. Die Substrate Glutamat (20 mM bzw. 5 mM) und Malat (10 mM oder 5 mM) waren entweder bereits im Medium enthalten oder wurden extra hinzugefügt. Die Menge des Mediums wurde so berechnet, dass bei Zugabe aller weiteren Substanzen ein Gesamtvolumen von ca. 1 ml in der Küvette vorhanden war. Vor Beginn der Messungen wurden außerdem die zu testenden Pharmaka hinzugefügt. Kontrollmessungen erfolgten zu Beginn jedes Messtages ohne zu testende Pharmaka. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurden 3-5 mal 5-25 µM  $\text{Ca}^{2+}$  im Abstand von 2 Minuten hinzugegeben, um die PTP zu öffnen. Durch das  $\text{Ca}^{2+}$  kam es zu einem Verlust des Membranpotentials an der IM mit nachfolgender Freisetzung von Safranin O und damit zu einem Anstieg der Safranin-O-Fluoreszenz. Ausgewertet wurde die Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben bzw. deren Gesamtmenge, die für eine Öffnung der PTP bzw. für den

Zusammenbruch des Membranpotentials notwendig waren. Bei den hier durchgeführten Experimenten handelt es sich um einzelne Experimentreihen, die der Ergänzung der Atmungs- und Schwellungsmessungen dienen und statistisch nicht ausgewertet wurden.

#### 5.2.6 Sauerstoffverbrauchsmessungen

Die Sauerstoffverbrauchsmessungen wurden mit dem OROBOROS Oxygraphen durchgeführt. Der OROBOROS Oxygraph ist ein mit zwei Kammern ausgestattetes Titrations-Injektions-Respirometer, das mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Prinzip Clark-Elektrode) die Abnahme der Sauerstoffkonzentration bzw. die Geschwindigkeit der Sauerstoffkonzentrationsänderung ( $d[O_2]/dt$ ) einer festgesetzten Mitochondrienmenge in einem Inkubationsmedium misst(113). Während der Messungen wurde die in den Kammern befindliche Lösung permanent mit Magnetrührern durchmischt. Die graphische Darstellung erfolgt durch das Programm DatLab 3.1. Zu Beginn jedes Messtages wurde eine Eichung der Sauerstoffelektroden durchgeführt. Hierzu wurde nach Zugabe von je 2 ml Medium die Messung gestartet. Nach Erreichen des „Steady States“ wurde je eine Spatelspitze Dithionit in beide Kammern gegeben. Dithionit bindet den in der Lösung befindlichen Sauerstoff und führt daher zu einer rapiden Abnahme der Sauerstoffkonzentration in den Kammern.

Für die eigentlichen Messungen wurden entweder Rattenleber- oder Rattenhirn-mitochondrien verwendet. Als Inkubationsmedien dienten ein KCl/Hansson-Medium (für RHM) oder ein Saccharose-Medium (für RLM). Das Medium, von dem jeweils 2 ml in eine Kammer gegeben wurde, wurde vor der Messung auf 30 °C erhitzt und mit  $O_2$  angereichert. Die Mitochondrien (initial eine Proteinmenge von 0,667 mg) wurden ebenso wie die zu überprüfenden Pharmaka vor Beginn der Messung zum Medium hinzugefügt. Da die Proteinkonzentration der Mitochondrienpräparation schwankte, wurde die Proteinmenge entsprechend angepasst, um eine ausreichend hohe ADP-Atmung zu erreichen (mind. 4 x so hoch wie die Glutamat/Malat-Atmung, s. u.). Die Kammern wurden anschließend mit Stopfen verschlossen, in denen sich Metallkapillaren als Zugänge für die Applikation weiterer Substanzen mittels Hamilton-Spritzen befinden.

Vor Beginn der eigentlichen Experimente erfolgten üblicherweise 2 Kontrollmessungen (ohne Pharmaka). Hierfür wurden die Mitochondrien in Saccharose- oder Hansson-Medium für 3-10 Minuten vorinkubiert (State 1). Dann wurden Glutamat/Malat (10 mM bzw. 5 mM), bei deren Oxidation NADH gebildet wird, hinzugegeben (State 2). Danach wurde entweder ADP hinzugefügt (0,5 mM bis 2 mM), um die maximale Atmung der Mitochondrien zu erhalten (State 3) und so die Qualität der Mitochondrien zu bestimmen. Bei gut präparierten Mitochondrien war die ADP-induzierte maximale Atmung 6 mal so groß wie nach Gabe von Glutamat/Malat (z.B. bei den Experimenten mit RLM und Epoetin alfa war der O<sub>2</sub>-Fluss pro V nach Gabe von Glutamat/Malat  $81 \pm 6$ , nach Gabe von 2 mM ADP  $445 \pm 53$  pmol/(s\*ml), n=7 ). Oder es wurde die PTP durch Zugabe von Ca<sup>2+</sup> (25-150 µM bei RLM und 500 – 1000 bei RHM) geöffnet. Letzteres führte zu dem typischen Anstieg der Beschleunigung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs auf den Ca<sup>2+</sup>-Gipfel, der sich durch den Antrieb der Atmung durch die Reduktion des ATP/ADP-Verhältnisses im Rahmen der PTP-Öffnung erklären lässt. Der darauffolgende Abfall des Ca<sup>2+</sup>-Gipfels ist möglicherweise durch den Verlust von endogenem NADH durch die geöffnete PTP bedingt. Der Wert nach Gabe von Ca<sup>2+</sup> wurde am tiefsten Punkt vor der anschließenden Gabe von exogenem NADH (0,1 bzw. 1 mM) nach 4-5 Minuten gemessen. Diese führte erneut zu einer Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs, da es zu einem Einstrom von NADH durch die offene PTP und einer Stimulation des Komplex 1 der Atmungskette kam. Anschließend erfolgten die eigentlichen Experimente nach Vorinkubation mit den zu testenden Pharmaka. Eine Besonderheit stellen die Titrationsexperimente mit dem Inhibitor des Atmungskettenkomplexes I Amytal (Stammlösung 20 mM) und dem Inhibitor des Atmungskettenkomplexes IV Natriumazid (NaN<sub>3</sub>, Stammlösung 10 mM) dar. Im Vergleich zu den anderen Atmungsmessungen wurde hier als NADH-generierendes Substrat neben Glutamat und Malat auch Pyruvat verwendet, bei der Natriumazidtitration zusätzlich Succinat als FADH<sub>2</sub>-generierendes Substrat. Außerdem wurde ADP gegeben, auf NADH hingegen verzichtet. Anschließend erfolgte die 6fache Gabe von Amytal bzw. Natriumazid in ansteigender Dosierung.

Nach den Messungen wurden die Kammern mit 98%igem Ethanol gereinigt.

### 5.2.7 Statistische Analyse

Alle statistisch ausgewerteten Experimente wurden in der Regel mindestens mit 3 unabhängigen Mitochondrienpräparationen durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mittels t-Test (Typ 1, einseitig, Microsoft Excel 2010, Version 14.0, Redmond, Washington, USA) miteinander verglichen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Atmungsmessungen

#### 6.1.1 Atmungsmessungen mit Epoetin alfa und Rattenlebermitochondrien (RLM) im Saccharose-Medium

Die Vorinkubation mit Epoetin alfa (0,001 U, 0,01 U, 0,1 U, 1 U, 10 U) ergab keine Unterschiede in der maximalen NADH-Antwort (Konzentration von NADH 1 mM) nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (siehe Abb. 6.1.1a-d). Nach Zugabe einer höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge (150  $\mu\text{M}$ ) kam es im Vergleich zu 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zu einer deutlich höheren NADH-Antwort (siehe Abb. 6.1.1e+f). Teilweise ließ sich bei einer Konzentration von 10 und 100 U Epoetin alfa ein erniedrigter  $\text{Ca}^{2+}$ -Gipfel beobachten. Bei den höheren Konzentrationen Epoetin alfa zeigte sich außerdem teilweise eine höhere Glutamat-/Malat-Atmung (nicht gezeigt). Ein möglicher Verdünnungseffekt bei der Zugabe von 100 U EPO (das entsprach einer Flüssigkeitsmenge von 50  $\mu\text{l}$  statt 10  $\mu\text{l}$  bei den anderen Epoetin alfa-Konzentrationen) sollte durch die initiale Reduktion des Mediums um 40  $\mu\text{l}$  vermieden werden (statt 2000  $\mu\text{l}$  nur 1960  $\mu\text{l}$ ).

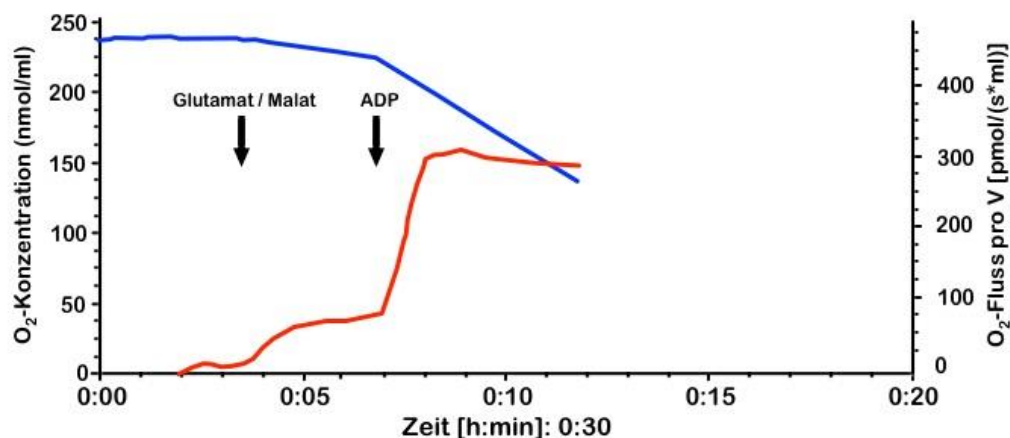


Abb. 6.1.1a

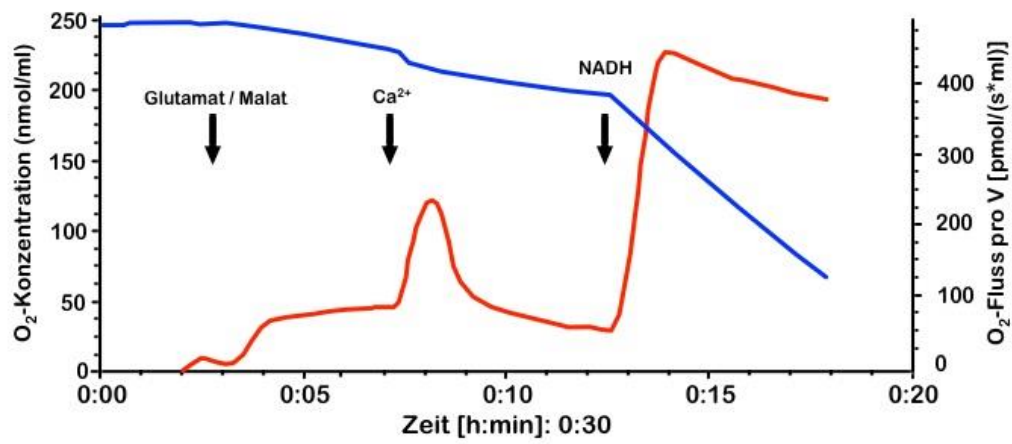


Abb. 6.1.1b

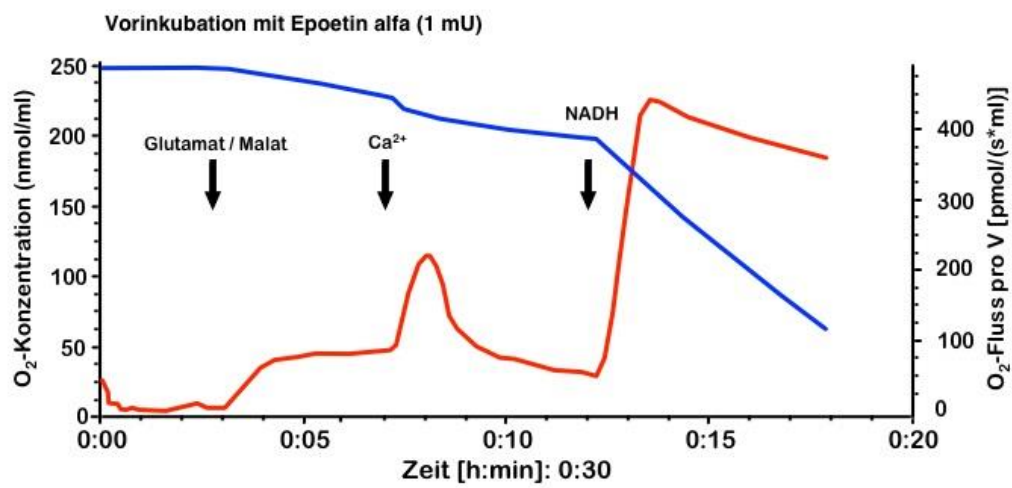


Abb. 6.1.1c

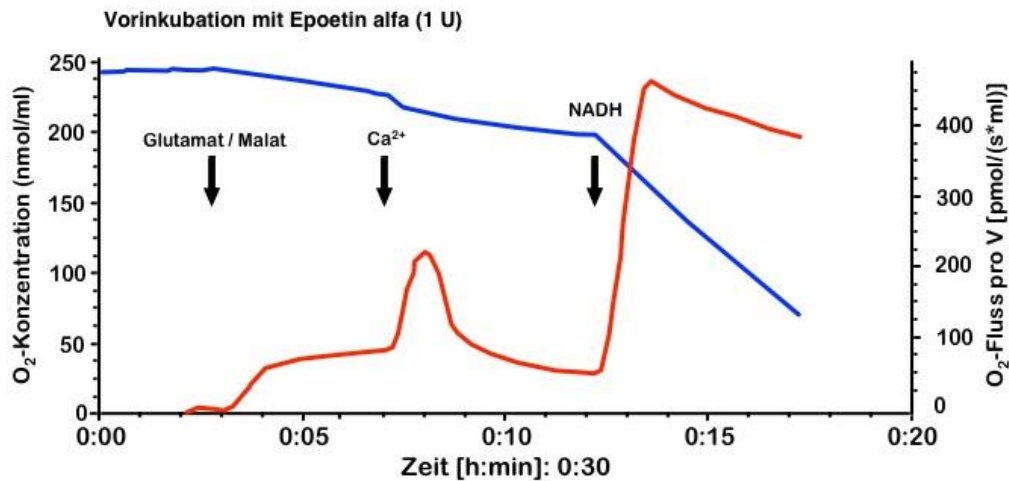


Abb. 6.1.1d

Abb. 6.1.1a-d: **Epoetin alfa bewirkt keinen Unterschied in der NADH-Atmung.** O<sub>2</sub>-Konzentration (blaue Kurve) und O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen (rote Kurve) nach **a** Zugabe von Glutamat/Malat und 2 mM ADP. Die Atmungsgeschwindigkeit steigt um das 4,7 fache an. **b** Zugabe von Glutamat/Malat, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> und 1 mM NADH; **c** Vorinkubation mit 1 mU Epoetin alfa sonst wie b; **d** Vorinkubation mit 1 U Epoetin alfa sonst wie b.

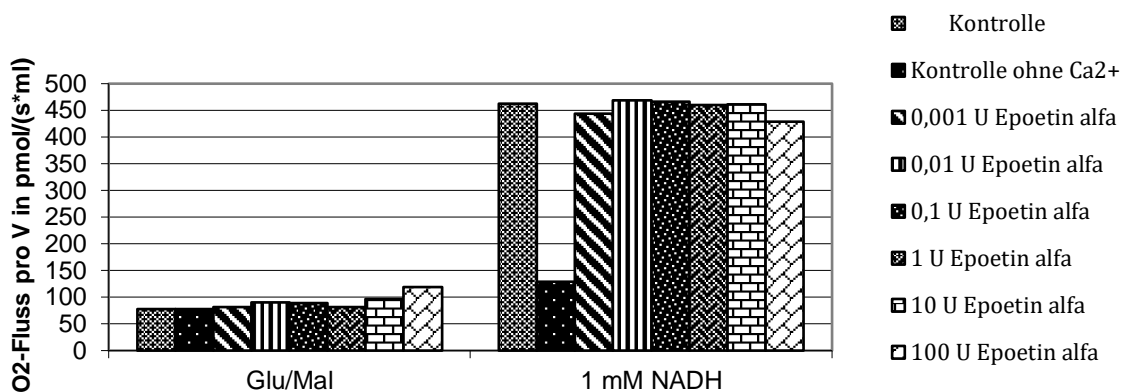


Abb. 6.1.1e: **Der Anstieg der NADH-Antwort nach Vorinkubation mit Epoetin alfa entspricht unabhängig von der Konzentration ungefähr dem Anstieg der NADH-Atmung ohne Vorinkubation mit Epoetin alfa.** Experimentelle Anordnung wie in Abb. 6.1.1a-d. O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen nach Zugabe von Glutamat/Malat, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> und 1 mM NADH, Vorinkubation mit Epoetin alfa (verschiedene Konzentrationen). Ohne Ca<sup>2+</sup> zeigt sich aufgrund der fehlenden Öffnung der PTP erwartungsgemäß kein Anstieg der NADH-Atmung. Gezeigt sind 2 Messungen aus 2 Präparationen (Kontrolle 4 Messungen).



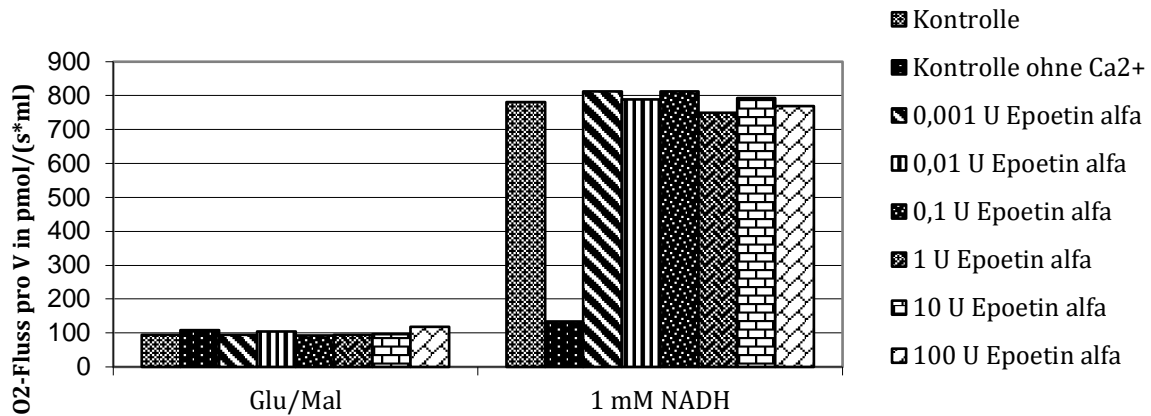


Abb. 6.1.1f: **100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  öffnet die PTP nicht vollständig.** O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen nach Zugabe von Glutamat/Malat, 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und 1 mM NADH, Vorinkubation mit Epoetin alfa (verschiedene Konzentrationen). Im Vergleich zu den Atmungsmessungen mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zeigt sich eine deutlich höhere NADH-Atmung. Auch hier zeigt sich trotz Epoetin alfa keine Änderung der NADH-Antwort. Gezeigt sind 4 Messungen aus 1 Präparation (Kontrolle 8 Messungen, Kontrolle ohne  $\text{Ca}^{2+}$  eine Messung).

### 6.1.2 Atmungsmessungen mit Epoetin alfa und Rattenhirnmitochondrien (RHM) im Hansson-Medium

Aus der Literatur ist zum einen bekannt, dass zwischen Peripherie und Gehirn u. a. Unterschiede in der Größe von Erythropoetin und seinem Rezeptor existieren, zum anderen, dass Erythropoetin protektiv auf Neurone wirkt (siehe Einleitung). Daher wurde ebenfalls mit Rattenhirnmitochondrien gearbeitet. Im Unterschied zu den Atmungsmessungen mit Rattenlebermitochondrien wurden hier 500  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  verwendet, da bei Rattenhirnmitochondrien eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erforderlich ist, um die PTP zu öffnen(114).

Bei den Experimenten mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ergab sich nach Vorinkubation mit 0,001 – 10 U Epoetin alfa keine Änderung der NADH-Atmung (Konzentration von NADH 1 mM) im Vergleich zur Kontrolle ohne Epoetin alfa. Bei 100 U Epoetin alfa zeigte sich, im Gegensatz zu den Experimenten mit Rattenlebermitochondrien, eine deutliche Abnahme der NADH-Atmung (Kontrolle 257 pmol/(s\*ml)  $\pm$  7 pmol/(s\*ml), n=12; 100 U Epoetin alfa 143 pmol/(s\*ml)  $\pm$  7 pmol/(s\*ml), n=6,  $p < 5,1 \cdot 10^{-5}$ ). Mit CsA war im Vergleich zu den Experimenten mit RLM (siehe Kapitel 6.1.3) nur eine geringfügige Verminderung der NADH-Atmung festzustellen (203 pmol/(s\*ml)  $\pm$  9 pmol/(s\*ml), n=5,  $p < 0,0002$  im Vergleich zur Kontrolle).

Zur Bestätigung eines möglichen EPO-Effekts wurde ein Kontrollexperiment mit hitzeinaktiviertem Epoetin alfa (100 U) durchgeführt. Dieses ergab keine Änderung des Atmungsverlaufs im Vergleich zum nicht hitzeinaktivierten EPO.

Um zu prüfen, ob der o. g. Effekt auch durch die mit Epoetin alfa gelösten Zusatzstoffe hervorgerufen werden kann, erfolgte außerdem ein Kontrollexperiment mit NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und Glycin (wie in 100 U Epoetin alfa enthalten, Endkonzentration der ersten drei Substanzen in der Kammer jeweils 25  $\mu\text{M}$ , im Originalpräparat < 1 mM, von Glycin 2,5  $\mu\text{M}$ , im Originalpräparat nicht angegeben). Dieses zeigte tendenziell eher eine leicht erhöhte NADH-Atmung. Als weiterer Inhaltsstoff wurde vom Hersteller Polysorbat 80 in einer Konzentration von 0,03% angegeben (Endkonzentration in der Kammer 0,00075%). Aus Verfügbarkeitsgründen ersetzten wir dieses mit Polysorbat 20 (Tween 20). Das Kontrollexperiment mit 0,0005% Polysorbat 20 ergab ebenso wie die Experimente mit 100 U Epoetin alfa eine deutliche Erniedrigung der NADH-Atmung. Bei höheren Konzentrationen von Polysorbat 20 war eine komplette Blockade der Atmung festzustellen (siehe Abb. 6.1.2a-e und Abb. 6.1.2f). Bei 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  bestätigte sich dieser Effekt. Insgesamt war die NADH-Atmung mit 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  im Vergleich zu 500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  höher (keine statistische Auswertung). Als Anmerkung ist zu erwähnen, dass sich in einigen Experimenten bereits ohne Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  ein Anstieg der NADH-Atmung zeigte.

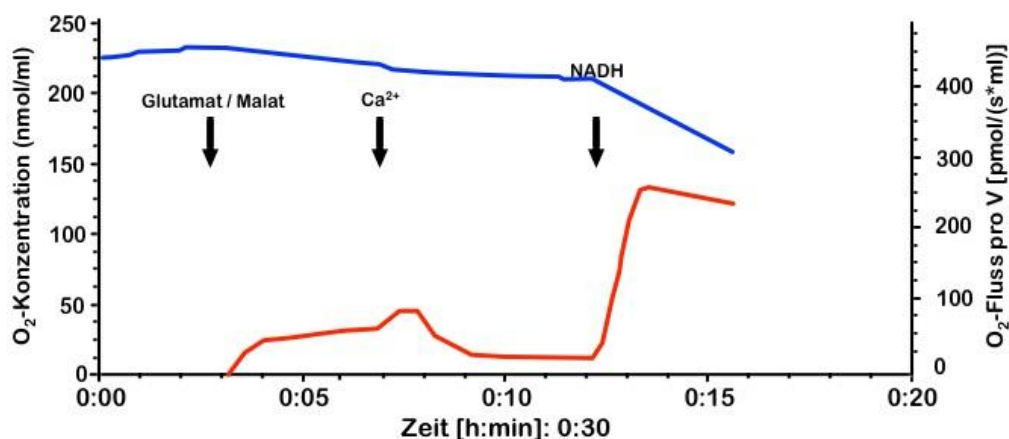


Abb. 6.1.2a

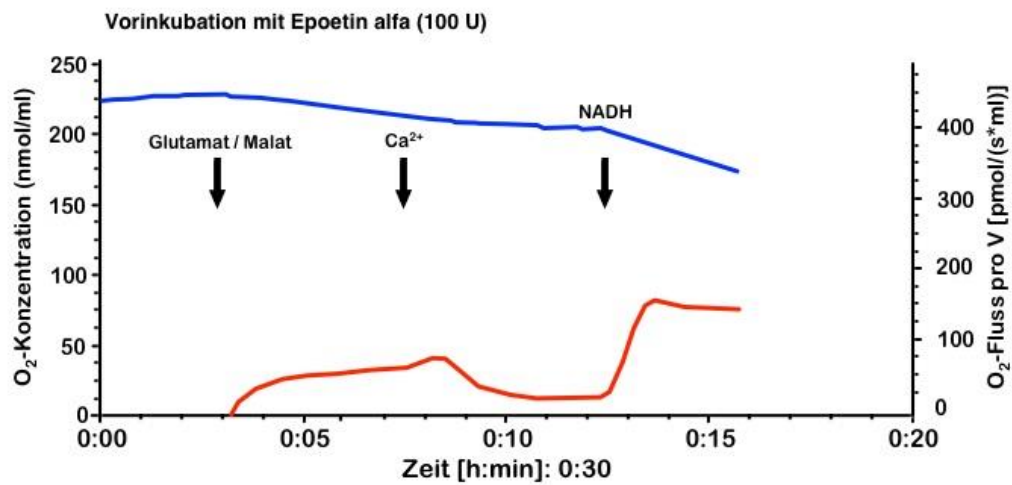


Abb. 6.1.2b

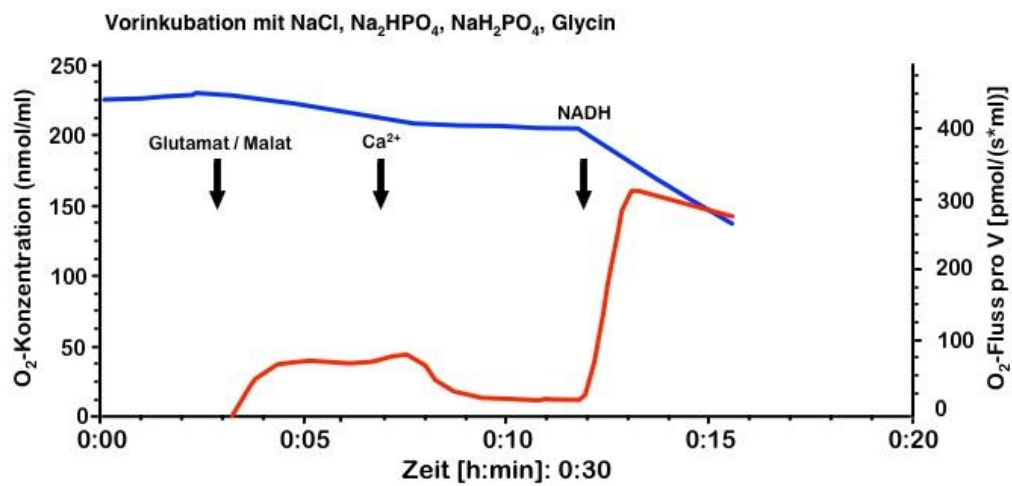


Abb. 6.1.2c

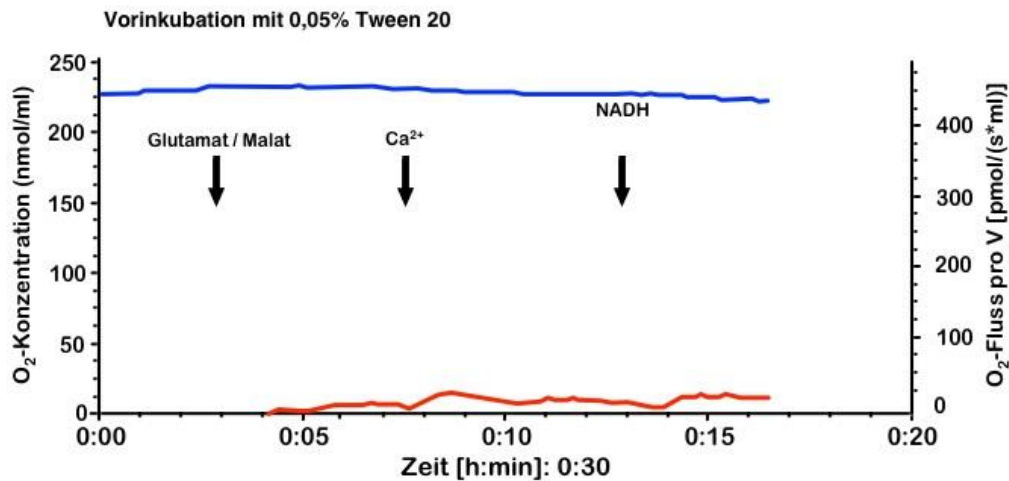


Abb. 6.1.2d

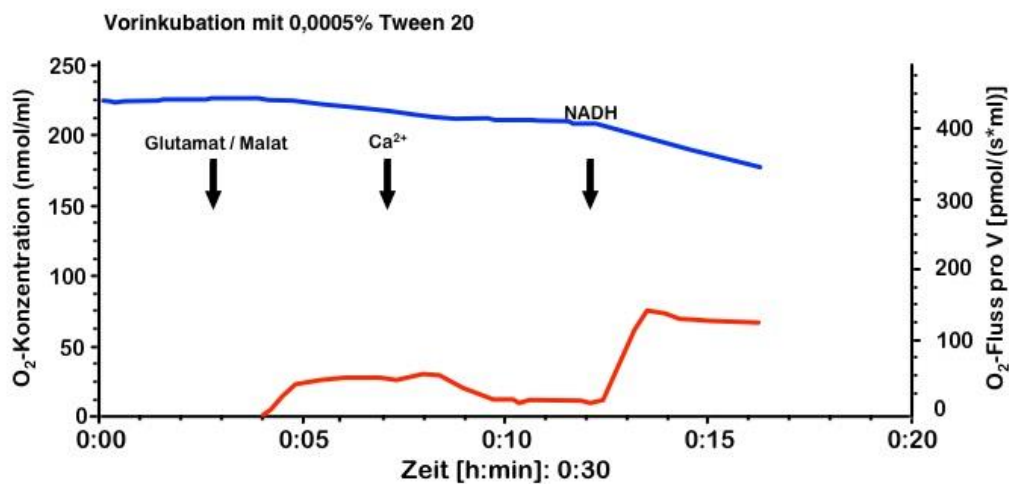


Abb. 6.1.2e

Abb.6.1.2a-e: **Epoetin alfa (100 U) und Tween 20 (0,0005%) bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung.** O<sub>2</sub>-Konzentration (blaue Kurve) und O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen (rote Kurve) nach **a** Zugabe von Glutamat/Malat, 500  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> und 1 mM NADH = Kontrolle; **b** Vorinkubation mit Epoetin alfa (100 U) sonst wie a. Die NADH-Antwort ist deutlich erniedrigt. **c** Vorinkubation mit NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Glycin (Endkonzentration in der Kammer der ersten drei Substanzen 25  $\mu$ M, von Glycin 2,5  $\mu$ M) sonst wie a. Die Höhe der NADH-Antwort liegt etwas über der der Kontrolle. **d** Vorinkubation mit 0,05% Tween 20 sonst wie a. Die Atmung kommt fast vollständig zum Erliegen. **e** Vorinkubation mit 0,0005% Tween. Die NADH-Atmung ist deutlich erniedrigt.

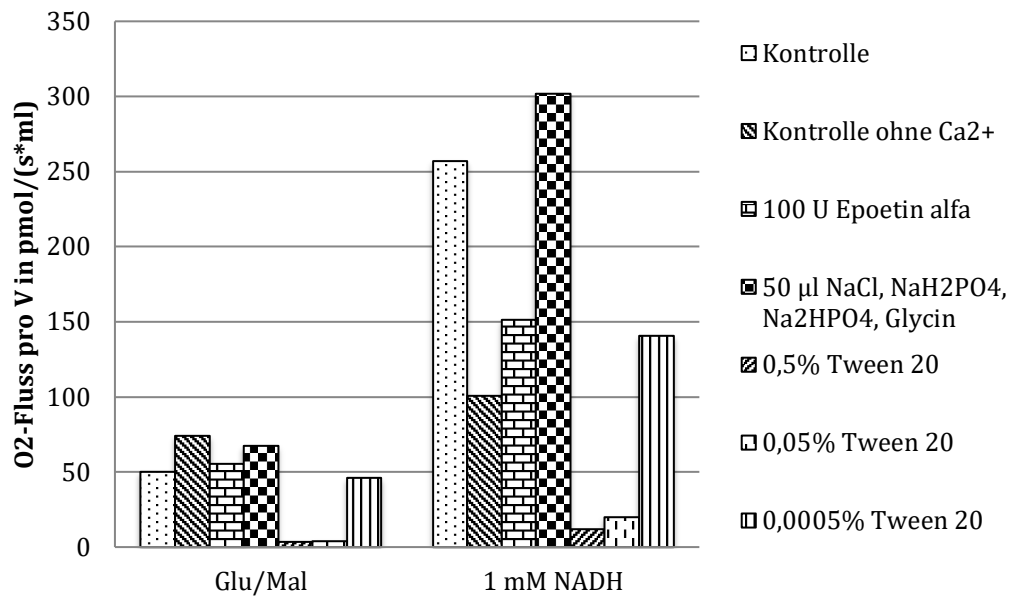


Abb. 6.1.2f: **Epoetin alfa (100 U) und Tween 20 (0,0005%) bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung.** O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen nach Zugabe von Glutamat/Malat, 500 µM Ca<sup>2+</sup> und 1 mM NADH, Vorinkubation mit Epoetin alfa bzw. Tween 20 (außer Kontrolle); graphische Darstellung eines Experiments. Höhere Konzentrationen von Tween 20 führen zu einer vollständigen Blockade der Atmung. Gezeigt sind 2 Messungen aus einer Präparation (0,05% und 0,0005% Tween 20 nur eine Messung).

### 6.1.3 Atmungsmessungen mit Human-EPO und RLM im Saccharose-Medium

Bei den initialen Experimenten mit 0,01 U, 0,1 U und 0,2 U Human-EPO konnte eine Dosis-abhängige Abnahme der NADH-Antwort festgestellt werden (siehe Abb. 6.1.3a, eine Experimentierreihe). Die Atmungsmessungen erfolgten sowohl mit 0,1 mM als auch 1 mM NADH. Hierbei zeigte sich bei 0,1 mM NADH in vielen Experimenten statt eines Plateaus ein kontinuierlicher Anstieg des NADH-Gipfels, sodass 2 Messwerte bestimmt wurden. Dieser kontinuierliche Anstieg des NADH-Gipfels trat bei den Kontrolluntersuchungen ohne Human-EPO und mit 1 mM NADH nicht auf.

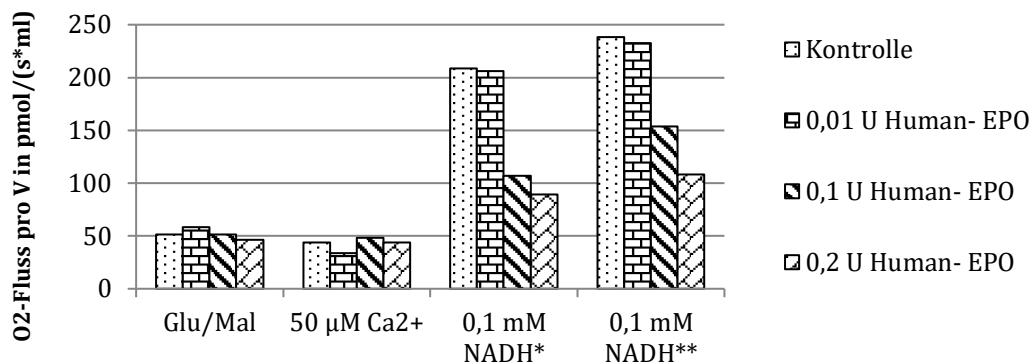
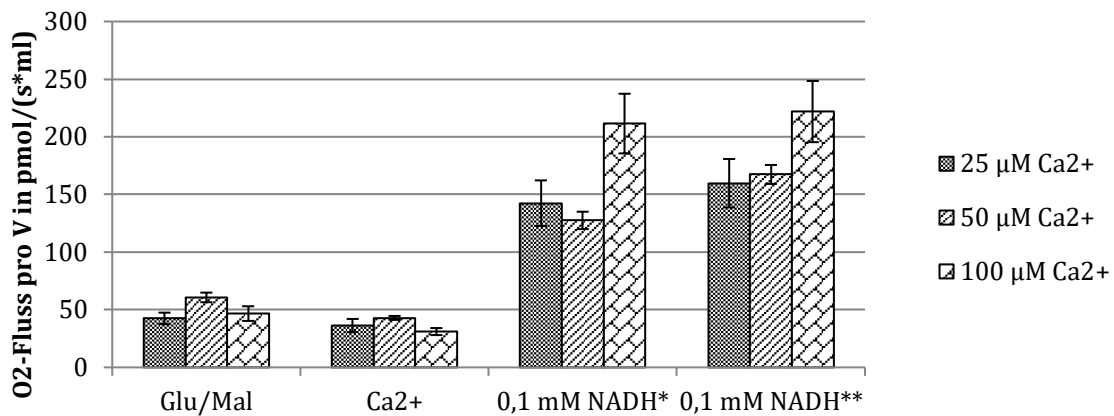


Abb. 6.1.3a: **Human-EPO bewirkt eine Dosis-abhängige Abnahme der NADH-Antwort.** *O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen nach Zugabe von Glutamat/Malat, 50 µM Ca<sup>2+</sup> und 0,1 mM NADH; Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Human-EPO. Aufgrund des kontinuierlichen Anstiegs der NADH-Antwort wurden jeweils 2 Werte gemessen: \*Werte nach 4 min., \*\*Maximalantwort. Gezeigt sind 2 Messungen aus 1 Präparation (Kontrolle 4 Messungen).*

Um festzustellen, ob es eine Abhängigkeit des Effekts von Human-EPO von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gibt, wurden Experimente mit 25 µM, 50 µM und 100 µM Ca<sup>2+</sup> durchgeführt. Bei Applikation von 100 µM Ca<sup>2+</sup> konnte mit 0,1 U Human-EPO im Vergleich zur Kontrolle kein Effekt nachgewiesen werden (Kontrolle 226 pmol/(s\*ml) ±17 pmol/(s\*ml), n=4; 0,1 U Human-EPO 211 pmol/(s\*ml) ±26 pmol/(s\*ml), n=4, p < 0,14). Bei 50 µM Ca<sup>2+</sup> (Kontrolle 207 pmol/(s\*ml) ±6 pmol/(s\*ml), n=10; 0,1 U Human-EPO 123 pmol/(s\*ml) ±8 pmol/(s\*ml), n=10, p < 5,7\*10<sup>-9</sup>) und 25 µM Ca<sup>2+</sup> (Kontrolle 146 pmol/(s\*ml) ±21 pmol/(s\*ml), n=6; 0,1 U Human-EPO 116 pmol/(s\*ml) ±20 pmol/(s\*ml), n=6, p < 0,0022) kam es hingegen zu einer deutlichen Abnahme der NADH-Antwort (insbesondere nach 4 min., 0,1 mM NADH, siehe Abb. 6.1.3b).



**Abb.6.1.3b: Mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es bei gleichbleibender Human-EPO-Konzentration zu einem Anstieg der NADH-Antwort.**  $\text{O}_2$ -Fluss pro Volumen nach Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO und anschließender Zugabe von Glutamat/Malat,  $\text{Ca}^{2+}$  (verschiedene Konzentrationen) und 0,1 mM NADH. Aufgrund des kontinuierlich schrägen Anstiegs der NADH-Antwort (ohne Plateau) wurden jeweils 2 Werte gemessen \*Werte nach 4 min., \*\*Maximalantwort. Gezeigt sind 4 Messungen aus 2 Präparationen (50 µM  $\text{Ca}^{2+}$  8 Messungen), Angabe der Werte jeweils mit SEM.

Um einen Effekt der dem Human-EPO zugesetzten Stabilisatoren und Antioxidantien auf die PTP auszuschließen, erfolgten Kontrollexperimente mit Na-Citrat und NaCl in der vom Hersteller angegebenen Dosierung (Endkonzentration 0,4 mM bzw. 1,7 mM, wie 0,1 U Human-EPO zugesetzt). NaCl ergab im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung der NADH-Atmung. Na-Citrat hingegen verminderte die NADH-Atmung, so dass sie etwa der Atmung in Anwesenheit von Human-EPO entsprach. Bei den Experimenten mit 0,1 mM NADH (Kontrolle 243 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 12 pmol/(s\*ml), n=10; 0,1 U Human-EPO 173 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 19 pmol/(s\*ml), n=6; p < 0,003; Na-Citrat 160 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 21 pmol/(s\*ml), n=6; p < 0,0004) zeigte sich dieser Effekt deutlicher als mit 1 mM NADH (Kontrolle 301 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 17 pmol/(s\*ml), n=7; 0,1 U Human-EPO 250 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 22 pmol/(s\*ml), n=6; p < 0,04; Na-Citrat 253 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 29 pmol/(s\*ml), n=7; p < 0,07; siehe Abb. 6.1.3m+n). Zum Vergleich wurde die PTP in einem Kontrollexperiment mit 10 µM CsA, einem bekannten Inhibitor der PTP, blockiert. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der NADH-Antwort (0,1 mM NADH: CsA 79 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 4 pmol/(s\*ml), n=3; 1 mM NADH: CsA 78 pmol/(s\*ml)  $\pm$ 2 pmol/(s\*ml), n=3) im Vergleich zur Kontrolle und zu den Experimenten mit Human-EPO/Na-Citrat (siehe Abb. 6.1.3c-l).

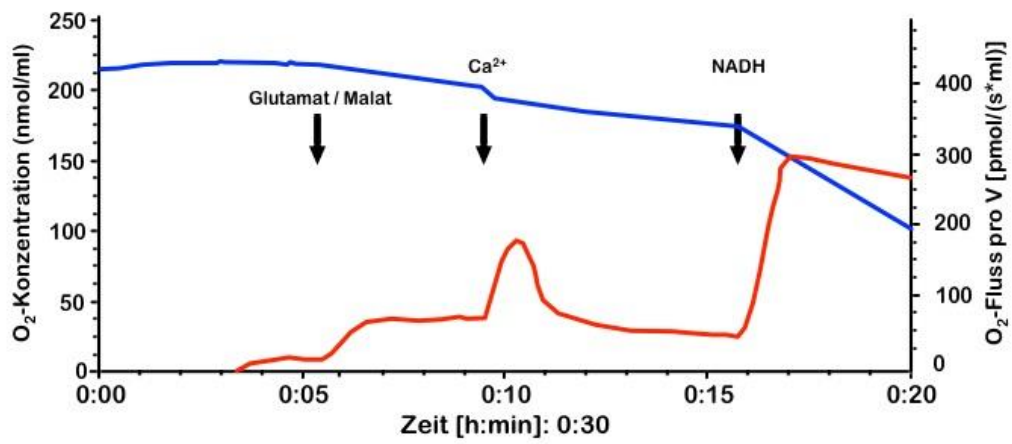


Abb. 6.1.3c:

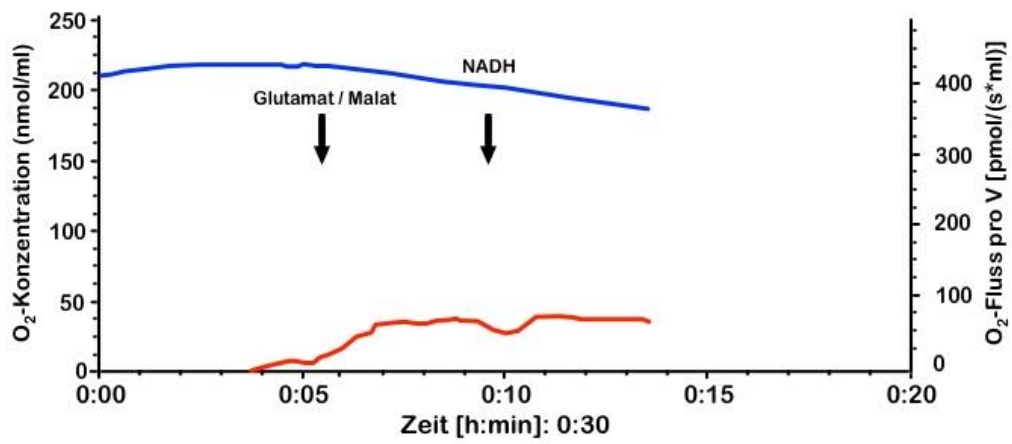


Abb. 6.1.3d:



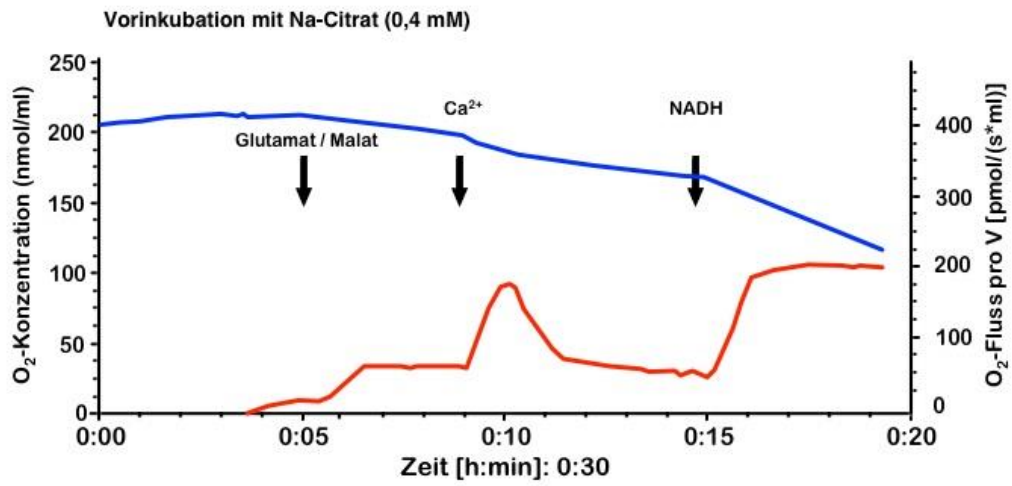


Abb. 6.1.3e:

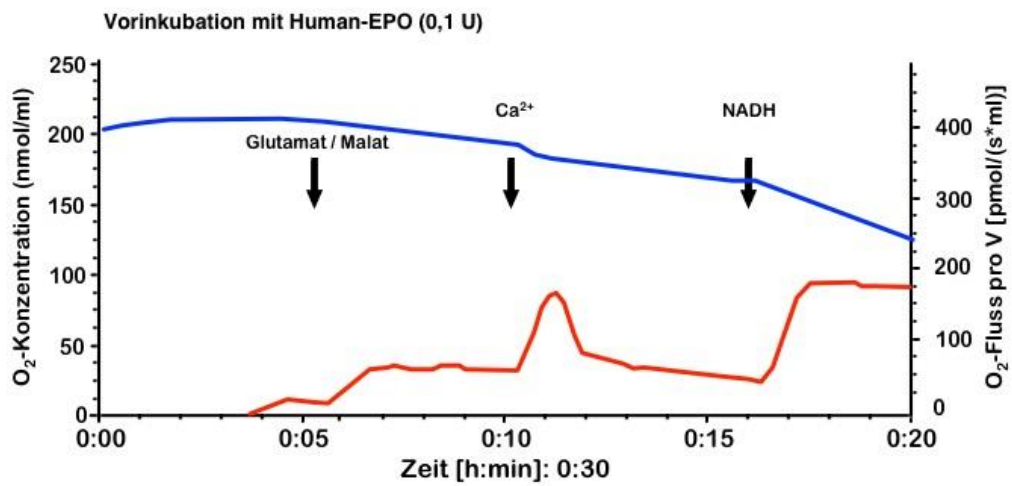


Abb. 6.1.3f:

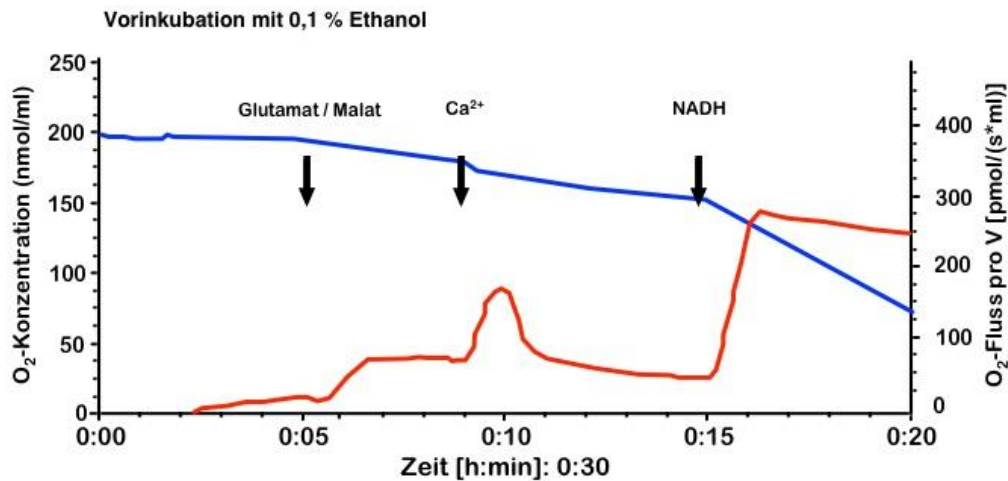


Abb. 6.1.3g:

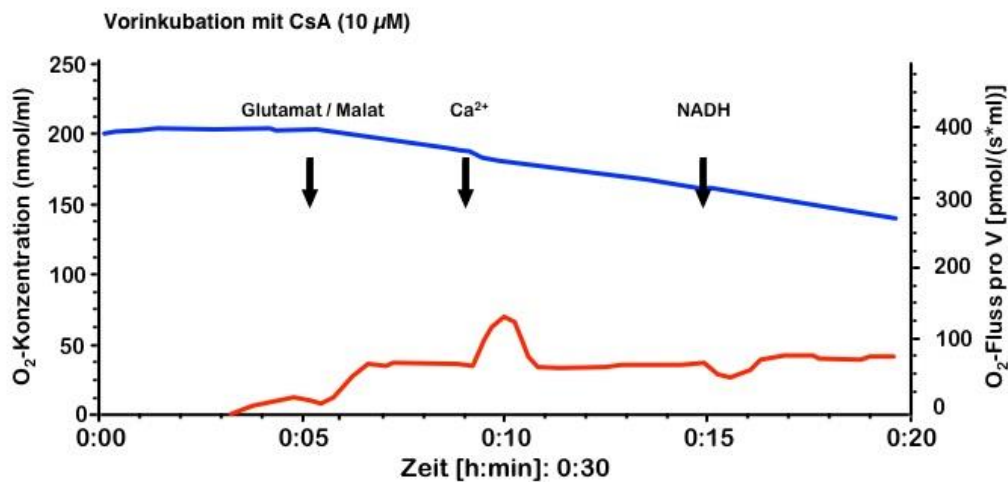


Abb. 6.1.3 h:

Abb. 6.1.3c-h: **Human-EPO und Na-Citrat bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung, die im Vergleich zur Abnahme nach Vorinkubation mit CsA geringer ausfällt.** O<sub>2</sub>-Konzentration (blaue Kurve) und O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen (rote Kurve) nach **c** Zugabe von Glutamat/Malat, 50  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> und 1 mM NADH = Kontrolle; **d** Zugabe von Glutamat/Malat und 1mM NADH. Aufgrund der fehlenden Öffnung der PTP durch Ca<sup>2+</sup> kommt es zu keinem Anstieg der Atmungsgeschwindigkeit nach NADH. **e** Vorinkubation mit 0,4 mM Na-Citrat sonst wie c. Die NADH-Atmung ist im Vergleich zur Kontrolle niedriger. **f** Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO sonst wie c. Auch hier zeigt sich eine Reduktion der NADH-Antwort im Vergleich zur Kontrolle. Diese entspricht in etwa der nach Vorinkubation mit Na-Citrat. **g** Vorinkubation mit 0,1% Ethanol sonst wie c. Die Höhe der NADH-Antwort entspricht in etwa der der Kontrolle, Kontrollexperiment zu Experiment mit CsA. **h** Vorinkubation mit 10  $\mu$ M CsA sonst wie c. Es zeigt sich kein Anstieg der Atmungsgeschwindigkeit nach Gabe von NADH.

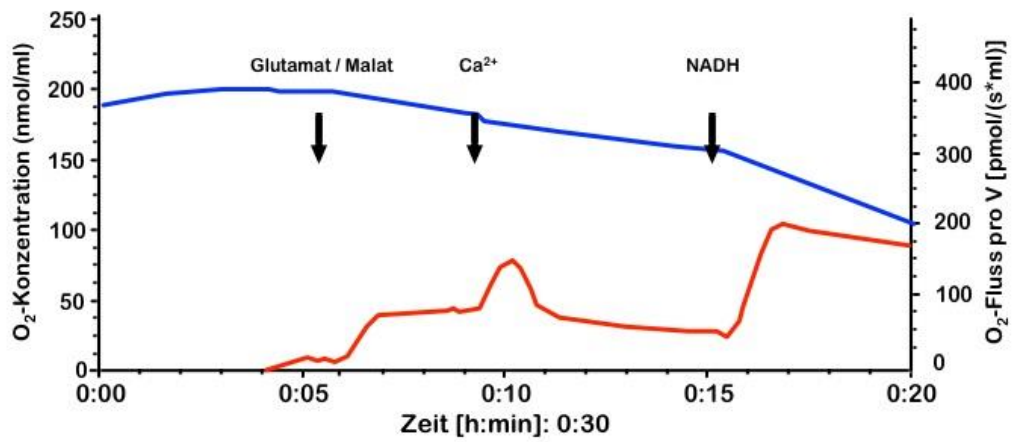


Abb. 6.1.3i:

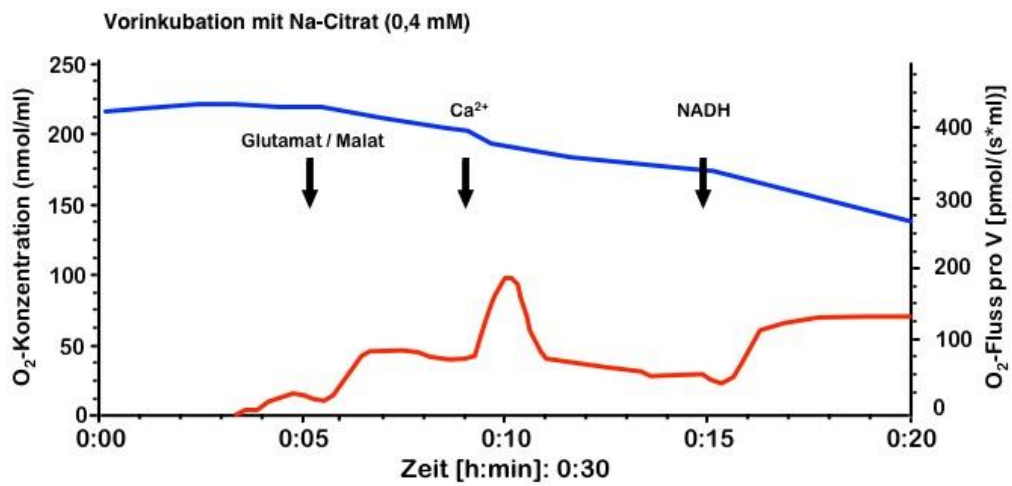


Abb. 6.1.3j:

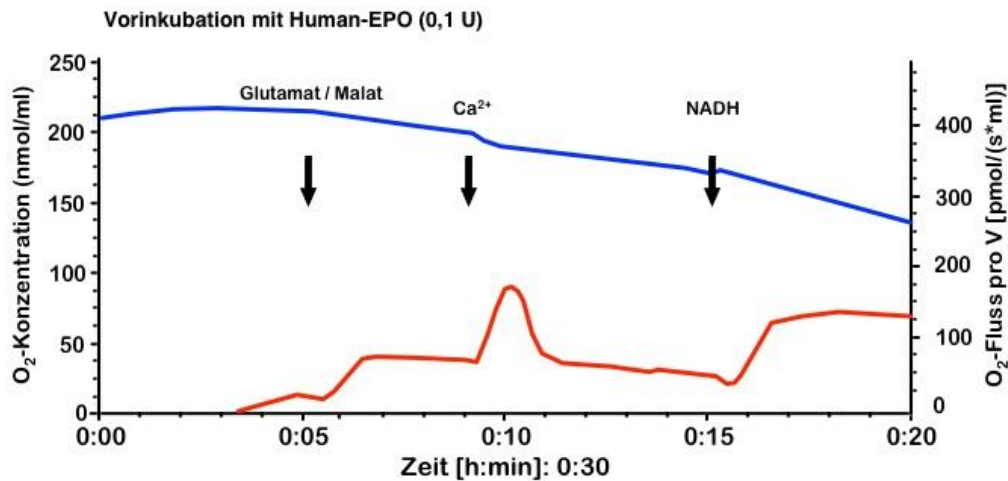


Abb. 6.1.3k:

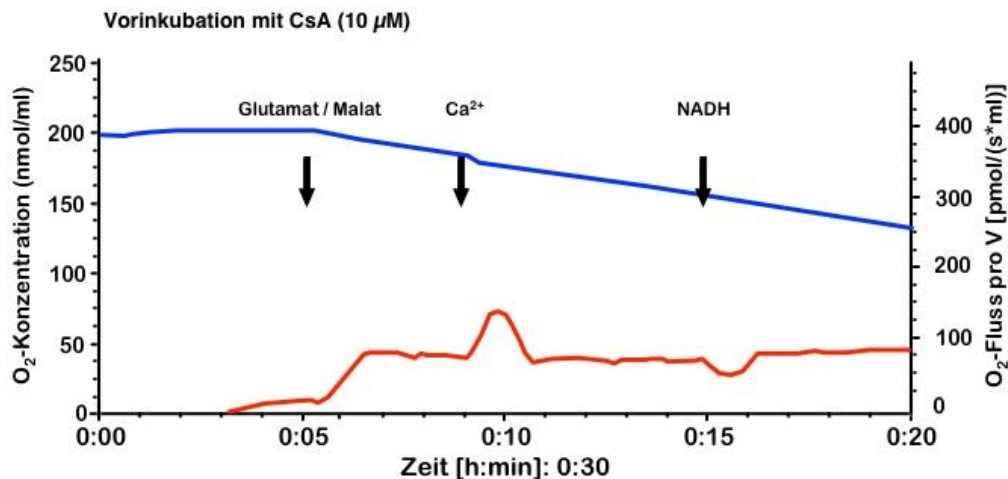


Abb. 6.1.3l:

Abb. 6.1.3i-l: **Human-EPO und Na-Citrat bewirken eine Abnahme der NADH-Atmung. Die NADH-Atmung fällt mit 0,1 mM NADH im Vergleich zu 1 mM NADH niedriger aus.**  $O_2$ -Konzentration (blaue Kurve) und  $O_2$ -Fluss pro Volumen (rote Kurve) nach **i** Zugabe von Glutamat/Malat, 50  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  und 0,1 mM NADH = Kontrolle; **j** Vorinkubation mit 0,4 mM Na-Citrat. Der NADH-Gipfel ist niedriger im Vergleich zur Kontrolle. **k** Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO. Die Höhe des NADH-Gipfels entspricht in etwa der nach Vorinkubation mit Na-Citrat. **l** Vorinkubation mit 10  $\mu$ M CsA. Wie oben zeigt sich eine Blockade der PTP.

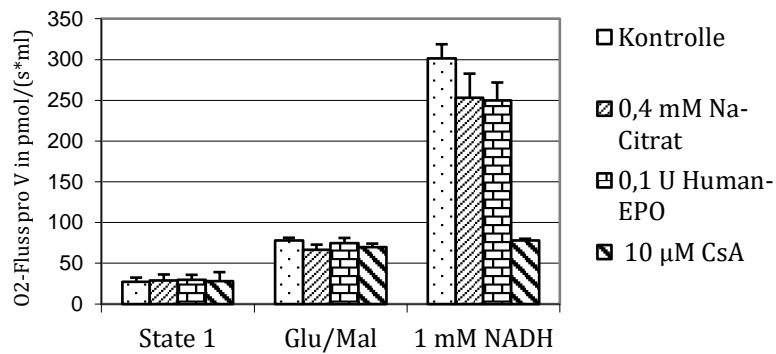


Abb. 6.1.3m

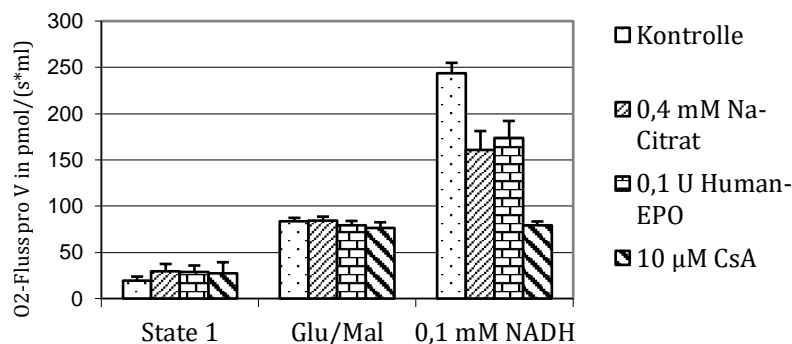


Abb. 6.1.3n

Abb. 6.1.3m+n: Sowohl Na-Citrat als auch Human-EPO vermindern die maximale NADH-Antwort. Bei 0,1 mM NADH ist der Unterschied im Vergleich zu 1 mM NADH stärker ausgeprägt. O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen in State 1, nach Zugabe von Glutamat/Malat, 50 µM Ca<sup>2+</sup> (nicht gezeigt) und NADH (Konzentration 0,1 mM bzw. 1 mM); Vorinkubation mit 0,4 mM Na-Citrat, 0,1 U Human-EPO oder 10 µM CsA. Gezeigt sind bei der Kontrolle Abb. 6.1.3m 7 Messungen, Abb. 6.1.3n 10 Messungen, bei Na-Citrat Abb. 6.1.3m 5 Messungen, Abb. 6.1.3n 6 Messungen, bei Human-EPO Abb. 6.1.3m+n 6 Messungen aus 4 Präparationen, bei CsA Abb. 6.1.3m+n 3 Messungen aus 2 Präparationen. Angabe der Werte jeweils mit SEM.

Um mögliche Effekte von Human-EPO auf die Atmungskette nachzuweisen, erfolgte jeweils ein Screeningexperiment (Titration) mit Amytal (Stammlösung 20 mM) und eines mit Natriumazid (Stammlösung 10 mM). Nach der Gabe von Amytal bzw. Natriumazid in ansteigender Dosierung kam es zu einer treppenartigen Abnahme der Atmung. Die Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO führte zu keiner Änderung des Atmungsverlaufs im Vergleich zur Kontrolle.

#### 6.1.4 Atmungsmessungen mit ARA 290 und RLM im Saccharose-Medium

Auch ARA 290 als selektiv gewebeprotectives Peptid zeigte keinen Effekt auf die NADH-Atmung. Atmungsmessungen wurden mit 1,5 nM, 15 nM, 30 nM, 75 nM, 150 nM, 1500

nM und 7500 nM ARA 290 durchgeführt (siehe Abb. 6.1.4a+b). Auch hier erfolgten die Messungen sowohl mit 0,1 mM als auch mit 1 mM NADH. Bei 1 mM NADH zeigte sich wie oben im Vergleich zu 0,1 mM NADH eine höhere NADH-Antwort. Ein kontinuierlicher Anstieg des NADH-Gipfels wie bei den Experimenten mit Human-EPO fiel nicht auf.

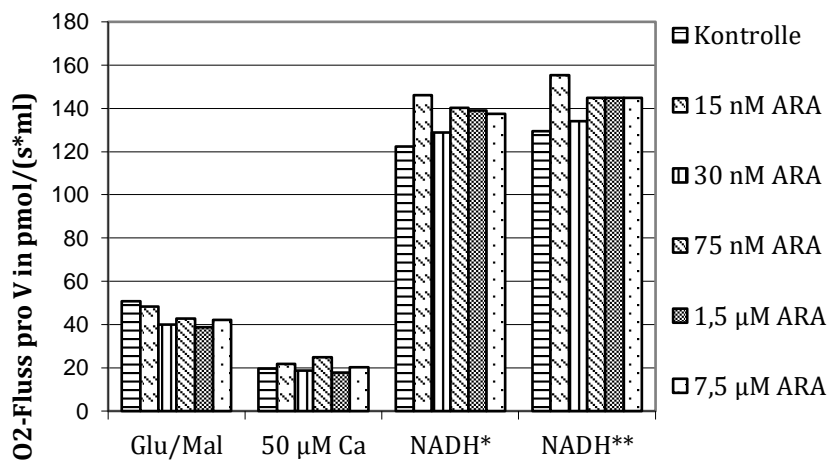


Abb. 6.1.4a

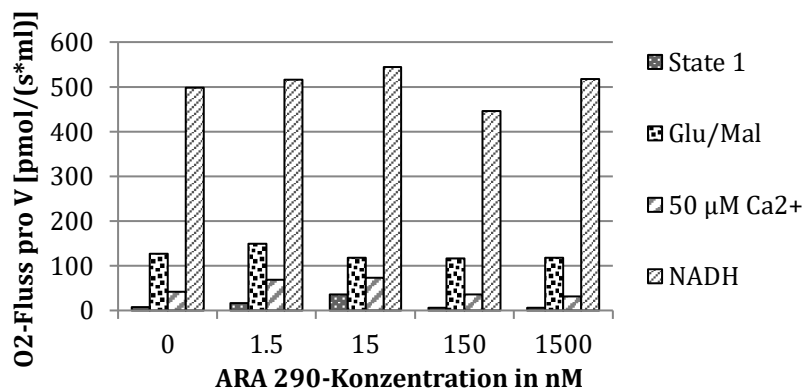


Abb. 6. 1.4b

Abb. 6.1.4a+b: **ARA 290 hat keinen Effekt auf die NADH-Atmung.** O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen nach Zugabe von Glutamat/Malat, 50 µM Ca<sup>2+</sup> und NADH (**a** Konzentration 0,1 mM; **b** Konzentration 1 mM); Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von ARA 290. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen ARA 290-Konzentrationen nachweisen. Die erhöhte NADH-Antwort nach 15 nM ARA 290 konnte in nachfolgenden Experimenten nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Human-EPO fiel kein deutlicher kontinuierlicher Anstieg des NADH-Gipfels auf. NADH-Gipfel Werte\* nach 4 min., \*\*Maximalantwort. Gezeigt ist eine 1 Messung aus 1 Präparation.

### 6.1.5 Atmungsmessungen mit ARA 290 und RHM im Hansson-Medium

Wir führten zunächst Messungen mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und 0,1 mM NADH durch, was zu einem relativ geringen Anstieg der NADH-Atmung führte. Es ließ sich bei keiner der getesteten ARA 290-Konzentrationen (1,5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$ ) ein ARA 290-Effekt feststellen. Aufgrund der höheren Pufferkapazität für  $\text{Ca}^{2+}$  in Hirnmitochondrien erfolgten anschließend Atmungsmessungen mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Da durch die deutlich höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch mehr Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) gebunden wird, erhöhten wir die  $\text{PO}_4^{3-}$ -Konzentration auf 5 mM (zuvor 1 mM). Hierdurch ließ sich in zwei Screeningexperimenten eine deutlich höhere NADH-Atmung und ADP-Atmung erzielen, jedoch weiterhin ohne reproduzierbaren Effekt der verschiedenen ARA-Konzentrationen (siehe Abb. 6.1.5a, ADP-Atmung nicht gezeigt). Die ADP-Atmung war mit 1,25 mM ADP höher als mit 0,5 mM. Kontrollexperimente mit DPBS (worin ARA 290 gelöst wurde) zeigten keine Änderung des Atmungsverlaufs. Einem Verdünnungseffekt sollte vorgebeugt werden, indem die durch die Substanz zugefügte Flüssigkeitsmenge im Voraus bereits von der Menge des Hansson-Mediums abgezogen wurde. Bei 7,5  $\mu\text{M}$  ARA 290 waren die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  DPBS, bei 15  $\mu\text{M}$  ARA 290 von 100  $\mu\text{l}$  DPBS notwendig. Auffällig war, wie bei den Experimenten mit Epoetin alfa und RHM, eine Erhöhung der NADH-Antwort auch ohne Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$ , die durch ARA 290 aber nicht beeinflusst wurde (siehe Abb. 6.1.5a).

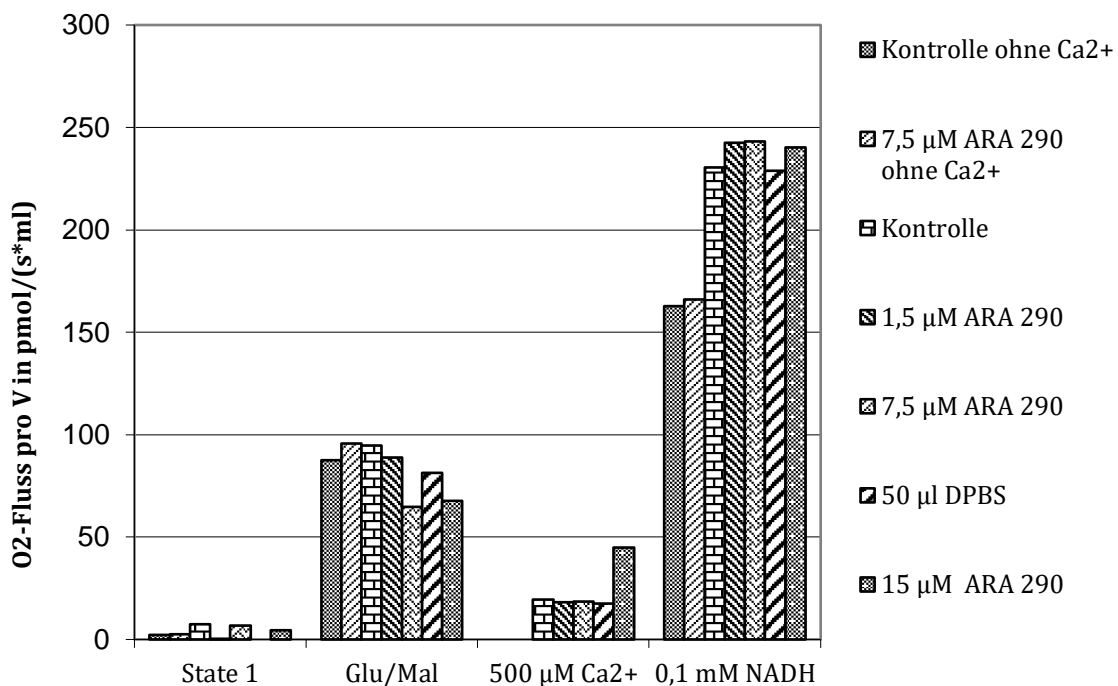


Abb. 6.1.5a: **Die verschiedenen Konzentrationen von ARA 290 führen zu keiner wesentlichen Änderung der NADH-Atmung.** O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen nach Zugabe von Glutamat/Malat, 500 µM Ca<sup>2+</sup> und 0,1 mM NADH, Vorinkubation mit ARA 290 (verschiedene Konzentrationen); Ohne Ca<sup>2+</sup> fällt die NADH-Antwort geringer aus, ist aber im Vergleich zur Glutamat/Malat-Atmung deutlich erhöht. Gezeigt ist 1 Messung aus 1 Präparation.

#### 6.1.6 Atmungsmessungen mit Ratten-EPO und RLM im Saccharose-Medium

Um zu prüfen, ob es eine Spezifität von Ratten-EPO für Rattenlebermitochondrien gibt, wurden Atmungsmessungen mit Ratten-EPO durchgeführt. Es zeigte sich keine Änderung der NADH-Atmung (Konzentration von NADH 0,1 mM) mit den verschiedenen Ratten-EPO-Konzentrationen (siehe Abb. 6.1.6a). Auch konnte keine Änderung der State-3-Atmung festgestellt werden (nicht gezeigt).



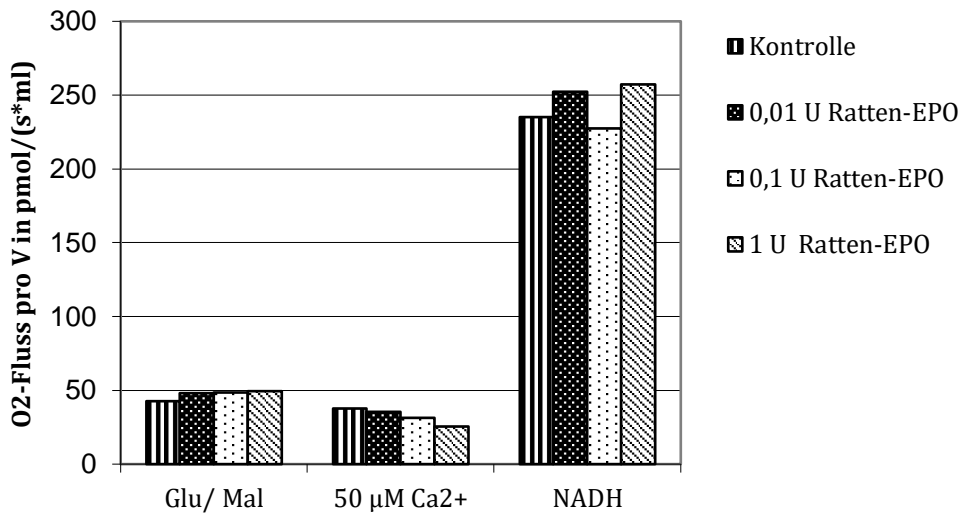


Abb. 6.1.6a: **Ratten-EPO hat keinen Effekt auf die NADH-Atmung.** O<sub>2</sub>-Fluss pro Volumen nach Zugabe von Glutamat/Malat, 50 µM Ca<sup>2+</sup> und 0,1 mM NADH; Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ratten-EPO; Es lässt sich keine Dosis-abhängige Änderung der NADH-Antwort feststellen. Gezeigt sind 2 Experimente aus 1 Präparation.

Zum Nachweis eines möglichen Effekts von Ratten-EPO auf die Membranstabilität führten wir ein Screeningexperiment mit dem Poren-bildenden Peptid Alamethicin (15 µg) durch. Nach dessen Gabe kam es zu einem starken Anstieg der NADH-Atmung (ohne Gabe von Ca<sup>2+</sup>). Im Vergleich zur Kontrolle konnte mit 1 U Ratten-EPO keine Änderung des Atmungsverlaufs festgestellt werden.

## 6.2 Schwellungsmessungen

### 6.2.1 Schwellungsmessungen mit Human-EPO und RLM im Hansson-Medium

Nach Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO wurde im Vergleich zur Kontrolle bei gleicher Ca<sup>2+</sup>-Menge eine signifikante Zeitverlängerung bis zum Eintreten einer irreversiblen Schwellung festgestellt (siehe Abb. 6.2.1a-c; Kontrolle 510s ±18s, n=9; Human-EPO 712s ±43s; n=4; p<0,003, 10 µM Ca<sup>2+</sup>). Dies zeigte sich bei Einzelgaben von 10 µM Ca<sup>2+</sup> eher als bei Einzelgaben von 50 µM Ca<sup>2+</sup>.

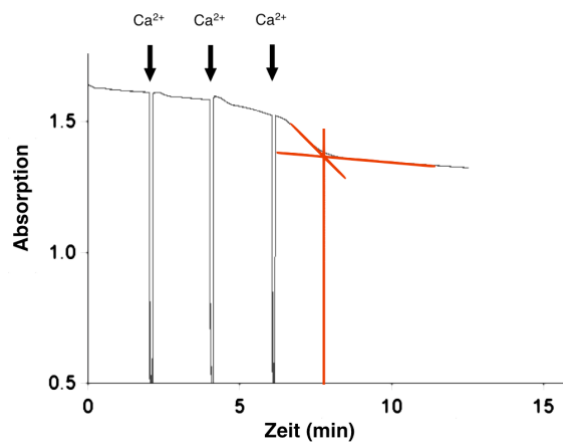


Abb. 6.2.1.a

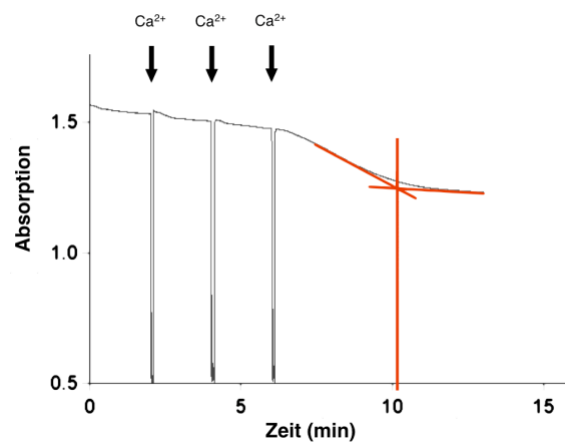


Abb. 6.2.1b

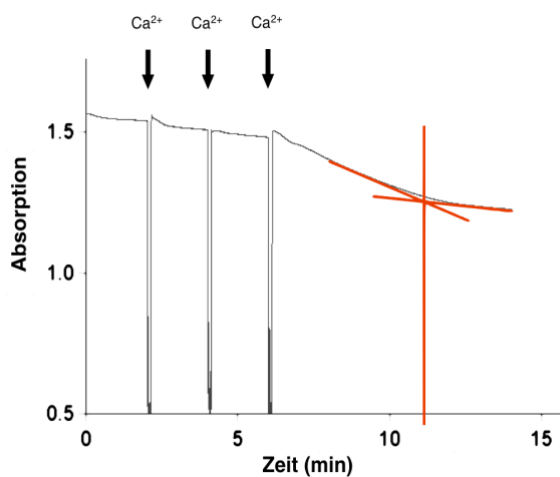


Abb. 6.2.1.c

Abb. 6.2.1a-c: **Human-EPO und Na-Citrat führen bei gleicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge zu einer Zeitverlängerung bis zum Eintritt einer irreversiblen Schwellung.** Absorption nach **a** Zugabe von  $3 \times 10 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  **b** Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO und Zugabe von  $3 \times 10 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und **c** Vorinkubation mit 0,4 mM Na-Citrat und Zugabe von  $3 \times 10 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .

Variierte man die Anzahl der Einzelgaben von  $\text{Ca}^{2+}$ , waren mit Human-EPO im Vergleich zur Kontrolle mehr  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben notwendig (siehe Abb. 6.2.1d-f).

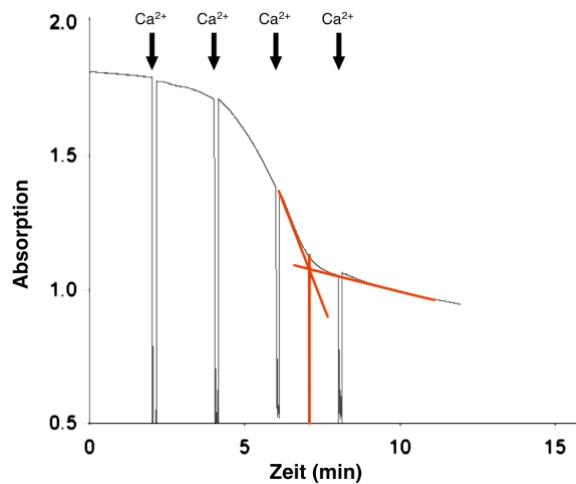


Abb. 6.2.1d

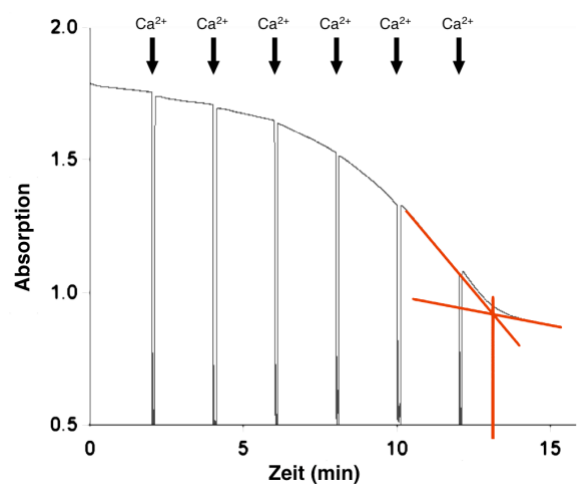


Abb. 6.2.1e

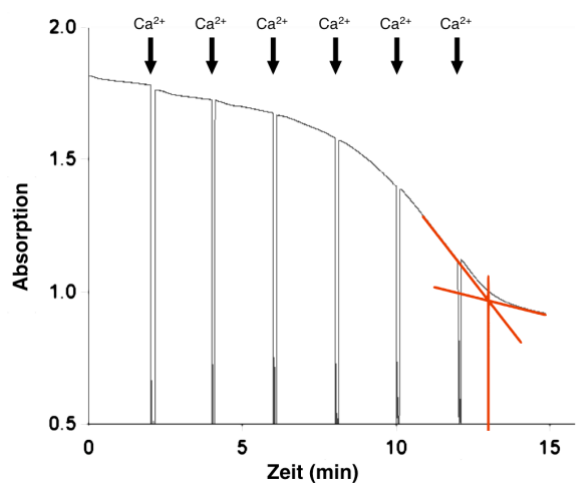


Abb. 6.2.1d-f: Mit Human-EPO und Na-Citrat sind mehr Einzelgaben von  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. eine längere Zeitspanne nötig, um eine irreversible Schwellung hervorzurufen. Absorption nach **a** Zugabe von  $4 \times 10 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  **b** Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO und Zugabe von  $6 \times 10 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und **c** Vorinkubation mit 0,4 mM Na-Citrat und Zugabe von  $6 \times 10 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .

Abb. 6.2.1f

Um zu überprüfen, ob der erwartete EPO-Effekt nicht durch Na-Citrat bei der EPO-Gabe verursacht wurde, wurden Kontrollmessungen mit Na-Citrat durchgeführt (Konzentration 0,4 mM, entspricht dem Na-Citrat-Gehalt, der 0,1 U Human-EPO zugesetzt ist, siehe Abb. 6.2.1. a-g). Die Zeitverlängerung bis zum Eintreten einer irreversiblen Schwellung entsprach in etwa der nach Vorinkubation mit Human-EPO (siehe Abb. 6.2.1g; Kontrolle  $510\text{s} \pm 18\text{s}$ ,  $n=9$ ; Na-Citrat  $730\text{s} \pm 27\text{s}$ ,  $n=4$ ,  $p < 0,0007$ ). Versuche, Na-Citrat mit  $\text{MgCl}$  zu komplexieren, um so einen wahren EPO-Effekt festzustellen, führten nicht zu einer Änderung der Zeit bis zur irreversiblen Schwellung. Wie bei den Atmungsmessungen erfolgte außerdem ein Einzelexperiment mit  $10 \mu\text{M}$  CsA als Inhibitor der PTP. Bei gleicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge konnte eine deutliche Zunahme der Zeit bis zur irreversiblen Schwellung im Vergleich zur Messung mit Human-EPO/Na-Citrat beobachtet werden (siehe Abb. 6.2.1g).

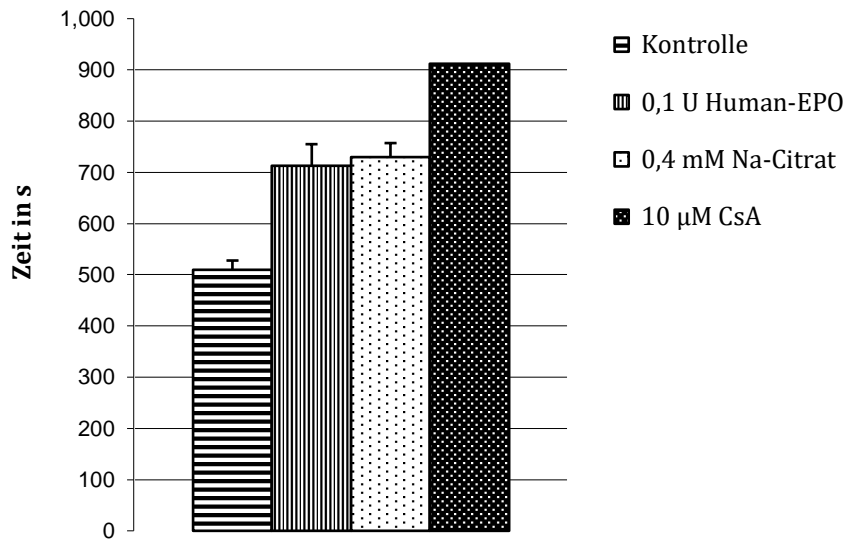


Abb. 6.2.1g: Bei Human-EPO und Na-Citrat kommt es zu einer deutlichen Verzögerung der irreversiblen Schwellung. Bei CsA zeigt sich eine noch stärkere Verzögerung der irreversiblen Schwellung im Sinne einer maximalen Blockade der PTP. Zeit in Sekunden bis zum Eintreten einer irreversiblen Schwellung nach Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO, 0,4 mM Na-Citrat und 10 µM Cyclosporin A; Gezeigt sind 4 Messungen (Kontrolle 9, Cyclosporin A 1) aus 4 Präparationen. Zeitangaben jeweils mit SEM.

## 6.2.2 Schwellungsmessungen mit ARA 290 und RLM im Hansson-Medium

Versuche wurden mit vier unterschiedlichen ARA 290-Konzentrationen (3 nM, 30 nM, 300 nM, 3000 nM) durchgeführt. Es ließ sich kein Effekt auf die Schwellung feststellen (siehe Abb. 6.2.2a+b mit 3000 nM ARA 290).

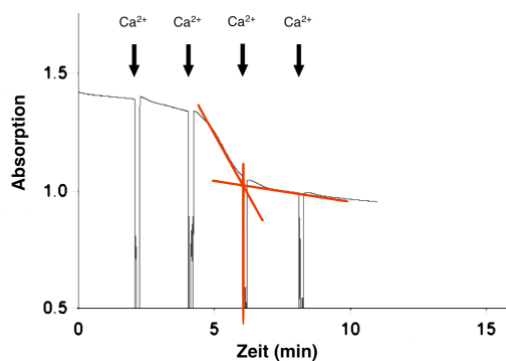


Abb. 6.2.2a

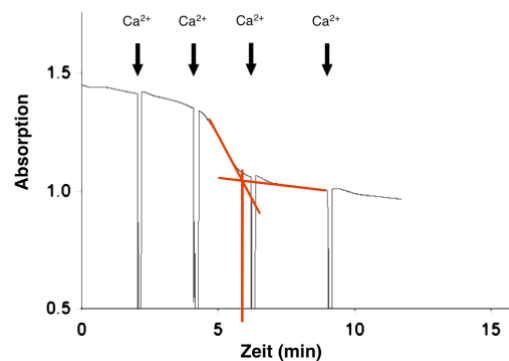


Abb. 6.2.2b

Abb. 6.2.2a+b: ARA 290 führt nicht zu einer Verzögerung der irreversiblen Schwellung. Absorption nach **a** Zugabe von  $4 \times 10^{-6}$  M  $\text{Ca}^{2+}$  **b** Vorinkubation mit 3000 nM ARA 290 und Zugabe von  $4 \times 10^{-6}$  M  $\text{Ca}^{2+}$

## 6.3 Membranpotentialmessungen

### 6.3.1 Membranpotentialmessungen mit Human-EPO und Na-Citrat/NaCl im Saccharose-Medium (mit RLM) und Hansson-Medium (mit RHM)

Vor den eigentlichen Messungen mit Human-EPO führten wir Kontrollmessungen mit und ohne Glutamat/Malat durch. Hierbei zeigte sich eine Abnahme der Calcium-Retention-Capacity ohne Glutamat/Malat (siehe Abb. 6.3.1a+b), was uns dazu veranlasste, nachfolgende Messungen mit Glutamat/Malat durchzuführen.

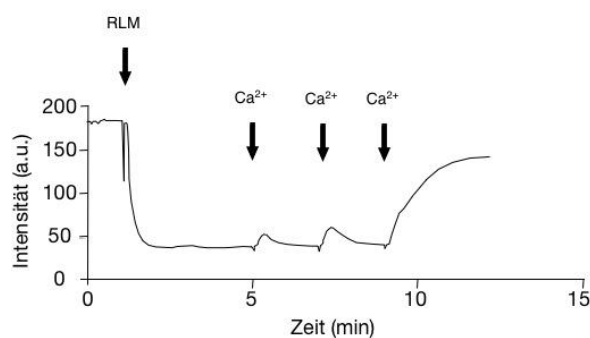


Abb. 6.3.1a

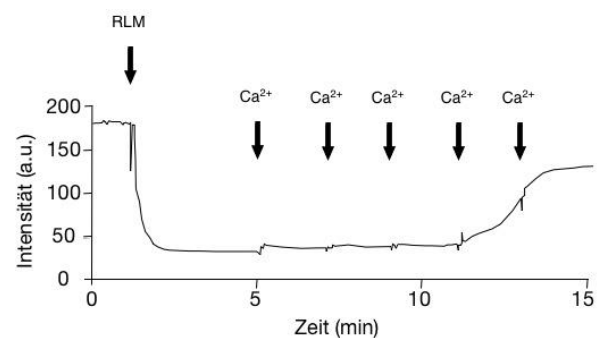


Abb. 6.3.1b

**Abb. 6.3.1a+b: Bei Zugabe von Glutamat/Malat erhöht sich die Calcium-Retention-Capacity.** Safranin-O-Fluoreszenz nach **a** Zugabe von RLM und  $\text{Ca}^{2+}$  (pro Gabe  $12,5 \mu\text{M}$ ), verwendetes Medium Saccharose-Medium; **b** Vorinkubation mit Glutamat/Malat sonst wie a. Nach Zugabe von Glutamat/Malat sind  $4 \times 12,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Endkonzentration  $50 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) notwendig, um die PTP zu öffnen und den Zusammenbruch des Membranpotentials zu bewirken, ohne Glutamat/Malat  $3 \times 12,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $= 37,5 \mu\text{M}$ ).

Bei der Kontrolluntersuchung mit RLM waren jeweils  $3 \times 25 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $= 75 \mu\text{M}$ ) bzw.  $3 \times 12,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $= 37,5 \mu\text{M}$ ; Endkonzentration auf 1 ml bezogen) notwendig, um eine irreversible Freisetzung des Safranin O und damit eine Zunahme der Safranin-O-Fluoreszenz zu bewirken. Nach Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO erhöhte sich die Anzahl der notwendigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben auf  $4 \times 25 \mu\text{M}$  ( $= 100 \mu\text{M}$ ) bzw.  $5 \times 12,5 \mu\text{M}$  ( $= 62,5 \mu\text{M}$ ). Bei RHM (in Hansson-Medium) zeigte sich dieser Unterschied nicht (jeweils  $4 \times 12,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$   $= 50 \mu\text{M}$ , anderer Messtag). Die Kontrollmessung bei RLM mit Na-Citrat/NaCl (Konzentration 0,4 mM/1,7 mM) differierte nicht wesentlich von der Messung mit Human-EPO (siehe Abb. 6.3.1c-e).

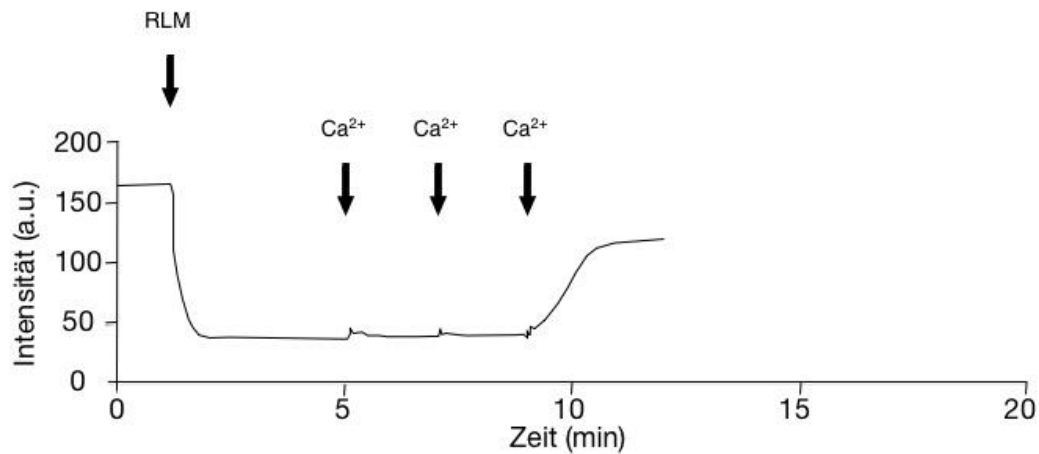


Abb. 6.3.1c:

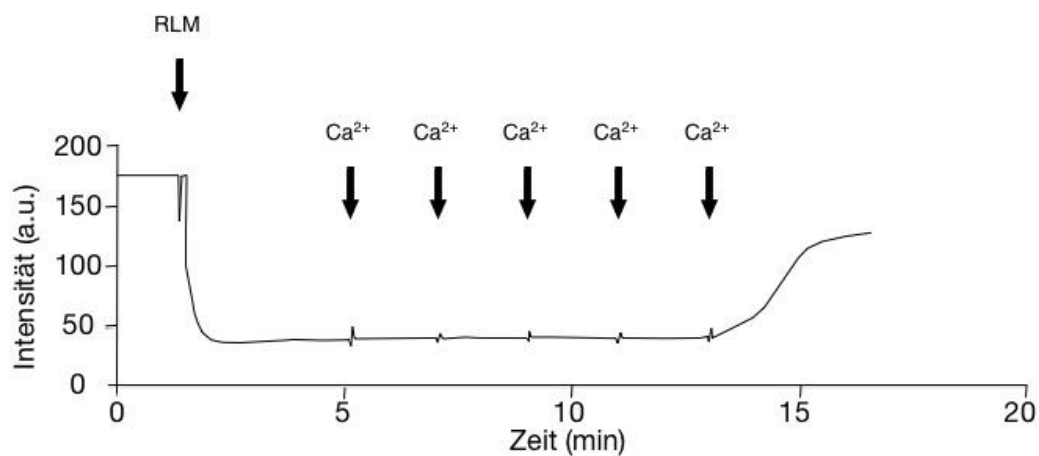


Abb. 6.3.1d:

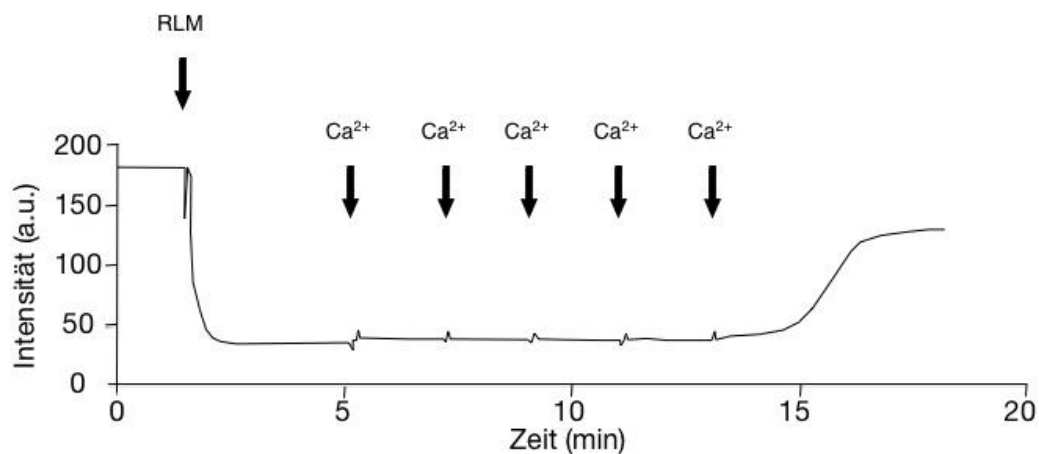


Abb. 6.3.1e:

Abb. 6.3.1c-e: **Nach Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO und 0,4 mM Na-Citrat/1,7 mM NaCl ist im Vergleich zur Kontrolle mehr  $\text{Ca}^{2+}$  erforderlich, um einen Zusammenbruch des Membranpotentials zu bewirken.** Safranin-O-Fluoreszenz nach Zugabe von RLM und  $\text{Ca}^{2+}$  (je Einzelgabe 12,5  $\mu\text{M}$ ); Glutamat/Malat ist zu Beginn des Experiments bereits enthalten, verwendetes Medium Saccharose-Medium; **c** Kontrolle **d** Vorinkubation mit 0,1 U Human-EPO **e** Vorinkubation mit 0,4 mM Na-Citrat/1,7 mM NaCl. Bei der Kontrolle sind 3 x 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 37,5  $\mu\text{M}$ ), nach Zugabe von Human-EPO oder Na-Citrat/NaCl 5 x 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 62,5  $\mu\text{M}$ ) notwendig, um den Zusammenbruch des Membranpotentials zu bewirken.

### 6.3.2 Membranpotentialmessungen mit ARA 290 und RLM und RHM im Hansson- und Saccharose-Medium

Die Experimente mit ARA 290 erfolgten sowohl im Saccharose-Medium als auch im Hansson-Medium mit einer jeweiligen Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$ . Es konnten keine Unterschiede in der Anzahl der benötigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben im Vergleich zur Kontrolle weder bei RLM noch bei RHM festgestellt werden.

Im Saccharose-Medium mit RLM waren ohne Zugabe von Glutamat/Malat 2 x 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 50  $\mu\text{M}$ ) bzw. 3 x 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 37,5  $\mu\text{M}$ ) notwendig, um einen irreversiblen Anstieg der Safranin-O-Fluoreszenz zu erreichen. Mit Glutamat/Malat trat der Zusammenbruch des Membranpotentials sowohl mit als auch ohne ARA 290 bei 3 x 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (=75  $\mu\text{M}$ ) auf.

Im Hansson-Medium (mit Glutamat/Malat) waren mit RLM 3 x 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 37,5  $\mu\text{M}$ , siehe Abb. 6.3.2a+b), bei RHM 2 x 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 50  $\mu\text{M}$ ) bzw. 3 x 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 37,5  $\mu\text{M}$ ) für einen irreversiblen Anstieg der Safranin-O-Fluoreszenz notwendig (3  $\mu\text{M}$  ARA nicht gemessen).

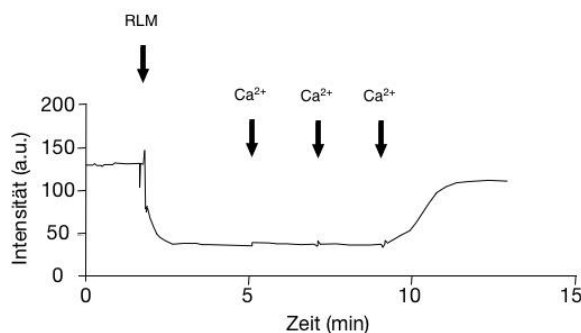


Abb. 6.3.2a

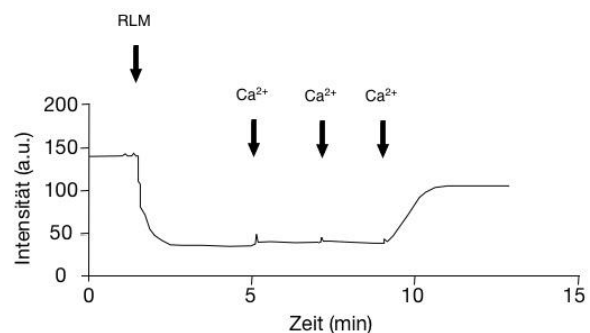


Abb.6.3.2b

Abb. 6.3.2a+b: **ARA 290 hat keinen Effekt auf das Membranpotential.** Safranin-O-Fluoreszenz nach Zugabe von RLM und  $\text{Ca}^{2+}$  (jeweils 12,5  $\mu\text{M}$ ); Glutamat/Malat ist zu Beginn des Experiments bereits im Hansson-Medium enthalten. **a** Kontrolle; **b** Vorinkubation mit 30  $\mu\text{M}$  ARA 290; Es zeigen sich keine Unterschiede hinsichtlich des Zusammenbruchs des Membranpotentials. Beide Male sind 3 x 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (= 37,5  $\mu\text{M}$ ) hierfür notwendig.

## 7. Diskussion

Den Anstoß für unsere Experimente und damit das Thema meiner Arbeit gaben erste Patch-Clamp-Versuche, deren Auswertung nahe zu legen schien, dass Human-EPO die Öffnungswahrscheinlichkeit der mitochondrialen PTP vermindert. Diese Interpretation führte zu der Hypothese, dass der neuroprotektive Effekt von EPO möglicherweise durch die Blockade der mitochondrialen PTP zustande kommt. Diese Hypothese sollte nun auch in anderen Versuchsanordnungen getestet werden. Das damals verwendete Erythropoetin entspricht dem in der aktuellen Arbeit verwendeten Human-Erythropoetin.

### 7.1 Überlegungen zur klinischen Anwendung und zur Dosisfindung

Eine Voraussetzung für die klinische Anwendung ist, dass exogen verabreichtes EPO in hoher Konzentration in den Blutkreislauf und den Liquor gelangt. Dies wurde u. a. von H. Ehrenreich in der „Göttingen EPO Stroke Study“ bewiesen. Nach der Gabe von  $3,3 \times 10^4$  U EPO wurde 3 h nach der Infusion eine Plasmakonzentration von  $4.132 \pm 561$  U gemessen (normale Plasmakonzentration ca. 20 mU/ml, siehe Einleitung). Die Liquorkonzentration lag nach der 2. Gabe von  $3,3 \times 10^4$  U EPO am 2. Tag bei  $17,1 \pm 5,6$  mU/ml (Kontrolle 0,7 mU/ml), woraus geschlossen wurde, dass EPO auch die Blut-Hirnschranke überwindet(92). Für die Annahme, dass das EPO-Molekül selbst über die Zellmembran gelangt, um an der mitochondrialen PTP zu wirken, existiert unseres Wissens bislang kein Beweis. Vorausgesetzt, dass diese Möglichkeit existiert, ist es ebenso unklar, wie viel EPO man systemisch applizieren müsste, um eine ausreichend hohe Konzentration an den Mitochondrien zu gewährleisten. In Zellkulturen wurde z. B. 10 U/ml verwendet(115), was sich in etwa mit den von uns verabreichten Konzentrationen deckt. Neben der Möglichkeit, dass exogen appliziertes EPO die Zellmembran überwindet und direkt an der mitochondrialen PTP wirkt, besteht außerdem die Möglichkeit, dass endogen produziertes EPO an die PTP bindet. Im neuronalen Gewebe wird es u. a. von Astrozyten, Neuronen selbst, aber auch von Endothelzellen produziert(116), im Lebergewebe von Hepatozyten und perisinusoidalen Ito-Zellen(117). Jedoch wird nicht nur das eigentliche EPO endogen produziert. Erst kürzlich wurde in humanem Serum und in Zellkulturen eine EPO-



Protein-Isoform entdeckt, die keinen Effekt auf erythroide Vorläuferzellen hat, sondern antiapoptotisch auf hippocampale Neurone von Ratten wirkte, die einem Sauerstoff- und Glucose-Mangel ausgesetzt waren. Dieses EV-3 genannte Protein wird von einem alternativ gespleißten EPO-Transkript mit einer Deletion des Exons 3 (hEPO $\Delta$ 3) kodiert, welches unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wurde(118).

## **7.2 Polysorbat bedingt die durch Epoetin alfa verursachte Verminderung der Atmung bei RHM**

Die Atmungsmessungen mit Epoetin alfa und RLM im Saccharose-Medium ergaben keine Minderung der NADH-Antwort und somit keinen Hinweis auf eine Änderung des Öffnungszustandes der PTP im Vergleich zur Kontrolle. Umso erstaunlicher war, dass sich bei 100 U Epoetin alfa an RHM im Hansson-Medium eine Abnahme der NADH-Antwort feststellen ließ. Zur Kontrolle wurden Experimente mit hitzeinaktiviertem Epoetin alfa in derselben Konzentration durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine Änderung des Atmungsverlaufs im Vergleich zu nicht hitzeinaktiviertem Epoetin alfa, sodass für eine Wirkung von Epoetin alfa kein Anhalt besteht. Stattdessen scheint Polysorbat 20 bzw. 80 für diesen Effekt verantwortlich zu sein (unter der Annahme, dass Polysorbat 20 und 80 eine ähnliche Wirkweise haben). Polysorbate sind ölige Substanzen, die sich vom PEG-ylierten Sorbitan, einem Derivat des Sorbitol, ableiten und mit Fettsäuren verestert sind. Als Emulgatoren werden sie in der pharmazeutischen, in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie verwendet. Eine Endkonzentration von 0,0005% Polysorbat 20 bewirkte neben der Verminderung der NADH-Antwort auch eine Erniedrigung der Glutamat/Malat-Atmung. Bei höheren Konzentrationen war sogar eine komplette Blockade der Atmung festzustellen. Im Originalprodukt der Firma Janssen-Cilag wurde eine Konzentration von 0,03% Polysorbat 80 (Endkonzentration in der Kammer 0,00075%) verwendet. Es stellen sich daher gleich mehrere Fragen: Hat Polysorbat 20 bzw. 80 einen Effekt auf die Atmungskettenkomplexe selbst? Oder beeinflussen sie das Membranpotential bzw. das Schwellungsverhalten von Mitochondrien? Wieso zeigt sich dieser Effekt nur bei RHM und nicht bei RLM? Ist eine Interaktion mit dem Medium (Hansson-Medium bei RHM statt Saccharose-Medium bei RLM) anzunehmen?

Eine mögliche Erklärung für die Blockade der Atmung wäre, dass Polysorbat zur Bildung von Mizellen führt oder dass Polysorbat Bestandteile aus den aus Gummi bestehenden Dichtungsringen des Oxygraphen herauslöst, die zu einer Schädigung der Mitochondrien führen. 1998 kam es zu einer Häufung von einer durch Antikörper ausgelösten Erythroblastopenie (*pure red cell aplasia*, PRCA), die nach der Applikation von ESA (*erythropoiesis-stimulating agent*), insbesondere Eprex® (Epoetin alfa), aufgetreten war. Damals war humanes Serumalbumin durch Polysorbat 80 als Stabilisator ausgetauscht worden(119). Es wurde u.a. vermutet, dass Polysorbat 80 organische Bestandteile aus den unbeschichteten Gummistopfen der Applikationsspritzen herausgelöst hatte bzw. die durch Polysorbat 80 ausgelöste Mizellenbildung eine Immunreaktion ausgelöst hatte.

Fast alle der sich in Deutschland in der klinischen Anwendung befindlichen Erythropoetin-Produkte werden laut Fachinformation u. a. mit Polysorbat 80 (z. B. Erypo®, Epoetin alfa) oder mit Polysorbat 20 konserviert (z. B. NeoRecormon®, Epoetin beta). Klinische/präklinische Studien werden u. a. mit Epoetin alfa(91, 120) (Polysorbat 80) oder Epoetin beta(121) (Polysorbat 20) durchgeführt. Umso dringender stellt sich die Frage, ob eine klinische Anwendung sicher ist. Bislang galten Polysorbate als unbedenklich. Der ADI-Wert (*acceptable daily intake*) liegt bei 10 mg/kg KG (Zusatzstoffe-online.de). 2015 konnte jedoch in einer Studie an Mäusen nachgewiesen werden, dass ein Anteil von 1% Polysorbat 80 im Trinkwasser über 12 Wochen zu einer gestörten Darmflora mit resultierender Entzündung, zu einer vermehrten Inzidenz von Adipositas bzw. dem metabolischen Syndrom und bei bestehender Prädisposition zu einer Kolitis führt. Die schützende Darm-Mukosa wurde um 2/3 reduziert(122). Eine andere präklinische Studie brachte die Entstehung einer Darmentzündung durch Polysorbat 80 mit einer Begünstigung der Kolon-Carcinogese in Verbindung. Durch Polysorbat 80 käme es zu einer Änderung des Mikrobioms des Darms, die zu einer Alteration in wichtigen Proliferations- und Apoptose-Signalwegen führe. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass der Lebensmittelzusatzstoff Carboxymethylcellulose zu ähnlichen Ergebnissen führte(123). In anderen Artikeln wurde über Hypersensitivitätsreaktionen auf Polysorbat 80 berichtet(124). In Anbetracht dessen stellt sich die Frage, ob eine Konzentration von 0,03% Polysorbat 80 in 1 ml Epoetin alfa bedenklich ist? Wenn man von einem Körpergewicht von 70 kg

ausgeht und den Wasseranteil mit 60% veranschlagt, läge die Konzentration von Polysorbat 80 in der wässrigen Phase bei  $7,1 \cdot 10^{-7} \%$  nach jeder Injektion. Fraglich ist, ob Polysorbat kumuliert oder über die Zellmembran gelangt

### **7.3 Das in Human-EPO enthaltene Na-Citrat führt über eine Bindung von $\text{Ca}^{2+}$ zu einer unechten Blockade der PTP**

Auch bei Human-EPO sahen wir zunächst eine Dosis-abhängige Abnahme der NADH-Antwort (bei 1 mM NADH und 0,1 mM NADH). Im Vergleich zu den bisherigen Experimenten fiel bei 0,1 mM NADH statt des Plateaus ein kontinuierlich schräger Anstieg des NADH-Gipfels auf. Dieser trat nur bei Zugabe von Human-EPO und nicht bei Zugabe von 1 mM NADH auf. Außerdem stellten wir fest, dass bei Zugabe von 0,1 U Human-EPO mit abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) die NADH-Antwort niedriger ausfiel, der Effekt des Human-EPO also zunahm. Bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zeigte sich hingegen kein Effekt des Human-EPO. Wir vermuteten zunächst eine Interaktion des  $\text{Ca}^{2+}$  mit Human-EPO oder eine konkurrierende Situation an der PTP. Auch hier führten wir Kontrollexperimente mit den zugesetzten Substanzen durch. Na-Citrat verminderte die NADH-Atmung, so dass sie etwa der in Anwesenheit von Human-EPO entsprach. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der erniedrigten NADH-Atmung eher um einen Na-Citrat-Effekt als einen EPO-Effekt handelt. Na-Citrat wird neben seiner Verwendung in der Lebensmittelindustrie (aufgrund des Geschmacks oder als Konservierungsmittel) und als Säureregulator auch als Antikoagulans in Blutröhrchen und bei Bluttransfusionen eingesetzt. Das Citrat-Ion fungiert als Chelator von  $\text{Ca}^{2+}$ , indem es einen Citrat-Calcium-Komplex bildet und so die Blutgerinnungskaskade unterbricht. Wir vermuten daher, dass Na-Citrat  $\text{Ca}^{2+}$  bindet und es daher für eine Öffnung der PTP nicht mehr zur Verfügung steht. 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  scheint die Kapazität von 0,4 mM Na-Citrat zu übersteigen, sodass sich die PTP dennoch öffnet. 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  scheint von 0,4 mM Na-Citrat fast vollständig gebunden zu werden, sodass kein  $\text{Ca}^{2+}$  für die Öffnung der PTP mehr vorhanden ist. Dies erklärt auch den über die Zeit kontinuierlichen Anstieg der NADH-Antwort mit Human-EPO. Durch die geringere Öffnung der PTP gelangt NADH nur allmählich an die IM. Dies macht sich insbesondere bei geringen Mengen NADH bemerkbar. Im Vergleich zu Human-EPO verursacht CsA eine echte Blockade, die aber ebenfalls von der Konzentration an freiem

$\text{Ca}^{2+}$  abhängig ist(125). Eine mögliche Fehlerquelle könnte sein, dass CsA initial nicht in 0,1% Ethanol sondern in 1% Ethanol gelöst war, sodass es sich bei dem CsA-Effekt auch um einen Mischeffekt von CsA und Ethanol handeln könnte. Allerdings gibt es Hinweise, dass Ethanol auf lange Sicht eher zu einer Öffnung der PTP führt (bei einer Experimentierdauer von 3 Monaten)(126).

Bei den Schwellungsmessungen bestätigte sich die Vermutung, dass es sich bei dem EPO-Effekt eher um einen Na-Citrat-Effekt handelt. Die Zeitverlängerung bis zum Eintreten einer irreversiblen Schwellung bei einer konstanten Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. die Anzahl der Einzelgaben an  $\text{Ca}^{2+}$  bis zum Eintreten einer irreversiblen Schwellung sind unter dem jeweiligen Einfluss von Human-EPO und Na-Citrat ähnlich. Im Vergleich zu Experimenten mit CsA waren die genannte Effekte deutlich geringer. Auch bei den Membranpotentialmessungen trat mit Human-EPO der Zusammenbruch des Membranpotentials später als bei der Kontrolle auf. Kontrollversuche mit Na-Citrat führten zum selben Ergebnis, sodass der verspätete Zusammenbruch des Membranpotentials ebenfalls auf die Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Na-Citrat und nicht auf eine Blockade der PTP hindeutet. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt nur bei RLM und nicht bei RHM. Insgesamt scheint der Zusammenbruch des Membranpotentials nicht nur von der Gesamtcalciummenge sondern auch von der Anzahl der Einzelgaben abzuhängen. So waren  $4 \times 25 \mu\text{M}$  (=  $100 \mu\text{M}$ ) bzw.  $5 \times 12,5 \mu\text{M}$  (=  $62,5 \mu\text{M}$ ) notwendig, um einen Anstieg der Safranin-O-Fluoreszenz zu bewirken.

In Bezug auf Na-Citrat ergeben sich ebenso wie bei Polysorbat 80 Bedenken in der klinischen Anwendung bzw. in der Verwendung in klinischen Studien. Das von Amgen für Johnson und Johnson produzierte Procrit® (Epoetin alfa) enthält auch Na-Citrat. Dieses wurde z. B. im „German Multicenter EPO Stroke Trial“ verwendet(94). Auch in präklinischen(127) oder experimentellen Studien(128) wird mit Na-Citrat konserviertes EPO appliziert. Kam es bei den mit EPO durchgeführten Studien möglicherweise zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch Na-Citrat? Sind Nebenwirkungen in der klinischen Anwendung auf Na-Citrat zurückzuführen? Oder hat Na-Citrat eher einen gewebeprotektiven Effekt? Häufige Nebenwirkungen von EPO sind laut Fachinformation u. a. eine dosisabhängige Blutdrucksteigerung und eine erhöhte Inzidenz thrombovaskulärer Ereignisse. Wirkt der  $\text{Ca}^{2+}$ -komplexierende Effekt von Na-Citrat dem

entgegen, da  $\text{Ca}^{2+}$  eine wichtige Rolle in der Vasokonstriktion (generell Muskelkontraktion) und in der Blutgerinnungskaskade spielt? Kontrollexperimente mit Na-Citrat sind unseres Wissens bislang nicht durchgeführt worden.

#### **7.4 ARA 290 und Ratten-EPO haben keinen Effekt auf die PTP**

Die Atmungsmessungen mit ARA 290 zeigten keine Beeinflussung der PTP. Auch die Schwellungs- und Membranpotentialmessungen konnten keinen Effekt von ARA 290 auf die PTP nachweisen. Eine Fehlermöglichkeit liegt in der Haltbarkeit von ARA 290, die vom Hersteller mit 2 Wochen in Lösung angegeben wurde. Unsere Experimente wurden jedoch über diesen Zeitraum hinweg durchgeführt, da die Substanz nicht nachbestellt werden konnte. Auch Ratten-EPO zeigte keine protektive Wirkung auf die PTP.

#### **7.5 RHM und RLM verhalten sich unterschiedlich**

Als Nebeneffekt fielen uns einige Unterschiede zwischen RLM und RHM auf. Bekannt ist, dass RHM zur Öffnung der PTP mehr  $\text{Ca}^{2+}$  als RLM benötigen(129). Ein Grund hierfür könnte sein, dass RHM im Vergleich zu RLM mehr  $\text{Ca}^{2+}$  in Form des unlöslichen Salzes  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  speichern, sodass die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  nicht ausreicht, um die PTP zu öffnen. Des Weiteren reagieren RLM und RHM unterschiedlich auf Substanzen, die den Öffnungszustand der PTP beeinflussen. So erhöht CsA die CRC bei RHM im Vergleich zu RLM in deutlich geringerem Maße(114). Beides konnten wir in unseren Atmungsexperimenten bestätigen.

Bei den anderen von uns festgestellten Unterschieden ist mitunter nicht klar, ob es sich um Unterschiede zwischen RHM und RLM oder um Unterschiede der benutzten Medien handelt. Generell verwendeten wir Hansson-Medium bei RHM und Saccharose-Medium bei RLM. Für eine Interaktion der Mitochondrien mit dem Medium gab es bereits Hinweise in mehreren experimentellen Studien. So beeinflusst z. B. das Tetrazyklin Minocyclin im Hansson-Medium das Schwellungsverhalten, das Membranpotential sowie die State-3-Atmung von RLM, nicht aber im Saccharose-Medium(130). Damals wurde vermutet, dass  $\text{K}^+$ -abhängige Ionentransportwege im Hansson-Medium, nicht

aber im Saccharose-Medium zum Tragen kommen. Insgesamt ist Hansson-Medium physiologischer als Saccharose-Medium.

Bei den von uns durchgeführten Atmungsmessungen zeigte sich in einigen Experimenten bei RHM nicht aber bei RLM bereits ohne Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  ein Anstieg der NADH-Atmung. Dies deutet darauf hin, dass die PTP bereits geöffnet war und NADH in die Mitochondrien gelangen konnte. Das könnte ein Indiz für eine schlechte Qualität der Mitochondrien infolge einer schlechten Präparation sein. Es wäre auch möglich, dass die PTP in RHM physiologisch schon offener ist als bei RLM. Alternativ käme eine Stimulation der Atmung durch AMP in Frage, welches von (bereits vorhandenem) NADH abgespalten und mittels Myokinase zu ADP phosphoryliert wird (P. Schönfeld, Magdeburg, mündlich). Warum dies nur bei RHM auftrat, könnte neben den unterschiedlichen Medien auch an der unterschiedlichen Präparationsweise liegen. So wird bei der Präparation von RLM Rinderserumalbumin, Protease Typ 1 und Digitonin verwendet, was bei RLM nicht der Fall ist. Ein weiterer Unterschied fiel uns bei den Experimenten mit Epoetin alfa auf. Epoetin alfa bzw. Polysorbat 80/20 hatte auf die NADH-Atmung bei RLM keinen Effekt, wohingegen es bei RHM eine deutliche Abnahme der NADH-Atmung bewirkte. Höhere Konzentrationen von Polysorbat als Epoetin alfa zugesetzt wurden bei RLM nicht getestet, sodass über eine generelle Suppression der Zellatmung keine Aussage getroffen werden kann.

Schwellungsmessungen wurden nur mit RLM durchgeführt, da bekannt ist, dass ungeschützte RHM (im Gegensatz zu mit ADP und CsA geschützten Mitochondrien) kaum schwellen(114). Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der höheren Stabilität von RHM aufgrund einer höheren Anzahl von Verbindungsstellen zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran im Vergleich zu RLM oder auch in unterschiedlichem Verhalten der PTP (D. Siemen, Magdeburg, mündlich). Bei den Membranpotentialmessungen wurde nach Vorinkubation mit Human-EPO/Na-Citrat bei RLM in Saccharose-Medium mehr  $\text{Ca}^{2+}$  im Vergleich zur Kontrolle benötigt um eine Depolarisation hervorzurufen. Ohne Human-EPO war bei RHM in Hansson-Medium zwar mehr  $\text{Ca}^{2+}$  als bei RLM in Saccharose-Medium notwendig. Die Anzahl der Gaben änderte sich nach Vorinkubation mit Human-EPO jedoch nicht. Mit ARA 290 führten wir eine Messung mit RLM und anschließend RHM im Hansson-Medium durch. Es waren

beide Male 3 Gaben á 12,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  notwendig, um eine Depolarisation hervorzurufen. Die Vermutung liegt also nahe, dass gewissen Unterschiede zwischen RHM und RLM durch das Medium bedingt sind. Abgesehen davon zeigt ein Kollaps des Membranpotentials bei ungeschützten RHM nicht notwendigerweise die Öffnung der PTP an. Versuche von Panov et al. zeigten, dass die Alkalisierung des Mediums als Indikator der PTP-Öffnung nicht mit dem Zusammenbruch des Membranpotentials zusammentraf(114), sodass die Ergebnisse der Membranpotentialmessungen mit Bedacht interpretiert werden sollten.

## 7.6 Sonstige Überlegungen

Neben den Unterschieden, die durch das Medium bzw. die Herkunft der Mitochondrien bedingt sind, scheint auch die Höhe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge, die für eine Öffnung der PTP notwendig ist, generell von der Qualität der Mitochondrien abhängig zu sein. Bei einigen Präparationen waren bei den Atmungsmessungen mit RLM 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ausreichend, um eine vollständige Öffnung der PTP zu bewirken, bei anderen waren bis zu 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  notwendig. Bei den Schwellungs- und Membranpotentialmessungen können Unterschiede in der erforderlichen Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben ebenfalls durch die unterschiedliche CRC an verschiedenen Messtagen und damit durch qualitativ unterschiedliche Präparationen bedingt sein. Die Höhe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gipfels hingegen scheint in keiner Beziehung zum Ausmaß der PTP-Öffnung zu stehen. Auffällig bezüglich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gipfels waren die Experimente mit 10 und 100 U Epoetin alfa und RLM. Bei ihnen war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gipfel im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt, ein Effekt, der möglicherweise Polysorbat 20 zuzuschreiben ist. Generell muss berücksichtigt werden, dass eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch ohne Öffnung der PTP eine Veränderung des Membranpotentials nach sich zieht. Außerdem hat  $\text{Ca}^{2+}$  Wirkungen auf viele andere Enzyme und dient als *second messenger*.

## 7.7 Schlussfolgerung

Trotz unterschiedlicher Methoden und unterschiedlicher Substanzen konnten wir keine direkte Wirkung von Erythropoetin oder seinen Derivaten auf die PTP nachweisen. Das spricht dafür, dass die gewebeprotective Wirkung von Erythropoetin über einen Rezeptor in der Zellmembran stattfindet. Die hämatopoetische Wirkung von Erythropoetin erfolgt über den EPOR<sub>2</sub>. Nach Brines et. al. erfolgt die gewebeprotective Wirkung von Erythropoetin über den IRR(80). Eine Schlüsselrolle in der sich anschließenden Signaltransduktion scheint die GSK-3 $\beta$  zu spielen, deren Phosphorylierung und damit Inhibition die PTP inhibiert. Nach Juhaszova et al. konvergiert auch die Signaltransduktion vieler anderer zell- und gewebeprotectiver Moleküle auf die GSK-3 $\beta$ . Diese wiederum reguliert das Gleichgewicht zwischen den anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Die Hemmung der GSK-3 $\beta$  bewirkt demnach eine Verschiebung in Richtung der anti-apoptotischen Mitglieder(16, 87). Dass auch Erythropoetin über die GSK-3 $\beta$  wirkt (unabhängig vom Rezeptor), wurde von Nishihara gezeigt(131).

Unsere Ergebnisse stellen einen besonderen Aspekt in den Fokus der EPO-Betrachtung: Auch die als Konservierungsstoffe/Stabilisatoren zugesetzten Substanzen haben einen Effekt, der die Wirkung der eigentlich zu testenden Substanz moduliert. Aus unseren Experimenten lässt sich erneut die Schlussfolgerung ziehen, dass Kontrollexperimente notwendig sind, sobald ein Effekt einer Substanz festgestellt wurde und dass Konservierungsstoffe/Stabilisatoren verstärkt auf ihre Neben-/Wirkung zu untersuchen sind, insbesondere auch, was den klinischen Einsatz betrifft.



## 8. Zusammenfassung

Das Vorhandensein eines Wachstumsfaktors für die Bildung von Erythrozyten wurde seit Beginn des 20. Jahrhunderts vermutet. Den Namen Erythropoetin (EPO) erhielt dieser Wachstumsfaktor allerdings erst 1948. Vor ca. 20 Jahren fielen positive kognitive Wirkungen bei Patienten, die EPO als Anämietherapie erhielten, auf. Viele weitere Studien bewiesen einen protektiven Effekt von EPO. In Anbetracht der steigenden Lebenserwartung und dem damit einhergehenden steigenden Risiko von u.a. kardiovaskulären Ereignissen liegt die klinische Anwendung von EPO daher nahe. Die erythropoetische Wirkung von Erythropoetin erfolgt über seinen EPO-Rezeptor (EPOR<sub>2</sub>). Der gewebeprotective Effekt soll hingegen über den *innate repair receptor* (IRR), der ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert ist, vermittelt werden. Insbesondere die Hemmung der mitochondrialen *permeability transition pore* (PTP) soll hierbei eine zentrale Rolle spielen. Ziel unserer Arbeit war es, einen möglichen direkten Effekt von EPO auf die PTP nachzuweisen. Hierzu bedienten wir uns der Sauerstoffverbrauchs-, der Membranpotential- und der Schwellungsmessung. Da unser Fokus auf der Neuroprotektion lag, führte ich nicht nur Experimente mit Rattenlebermitochondrien (RLM), sondern auch mit Rattenhirnmitochondrien (RHM) durch. Außerdem wurde neben EPO selbst auch ein rein gewebeprotectives Derivat mit dem Namen ARA 290 getestet. Die Ergebnisse konnten unsere Erwartungen nicht erfüllen. Ein direkter Effekt von EPO auf die PTP ließ sich mit keiner der genannten Methoden nachweisen. Es zeigte sich zwar mit Human-EPO und Epoetin alfa eine verminderte Schwellung (Human-EPO), ein verspäteter Zusammenbruch des Membranpotentials (Human-EPO) und ein verminderter Anstieg der NADH-Atmung in den Sauerstoffverbrauchsmessungen (Human-EPO, Epoetin alfa) nach Ca<sup>2+</sup>-Gabe. Kontrollmessungen ergaben jedoch, dass diese Effekte dem zur Stabilisierung und Konservierung zugesetzten Na-Citrat (Human-EPO) und Polysorbat 80/20 (Epoetin alfa/ Erypo®) zuzuschreiben waren. Polysorbat 20 (wegen fehlender Verfügbarkeit von Polysorbat 80) verminderte nicht nur die NADH-Atmung sondern die gesamte mitochondriale Atmung. Hieraus ergibt sich die außerordentlich wichtige Frage, wie bedenklich eine dauerhafte klinische Anwendung von Epoetin alfa/Erypo® im Rahmen der Anämietherapie ist. Auch Na-Citrat mag aufgrund seiner Ca<sup>2+</sup>-komplexierenden Wirkung nicht ganz unbedenklich sein. Wünschenswert wäre es daher, sowohl in der klinischen Anwendung von EPO als auch in klinischen und experimentellen Studien die beigesetzten Zusatzstoffe zu berücksichtigen.

## 9. Literatur

1. Duszynski J, Koziel R, Brutkowski W, Szczepanowska J, Zablocki K. The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):380-7.
2. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):57-61.
3. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem*. 1955;217(1):409-27.
4. Nicholls DG. Bioenergetics. Fourth edition. p. 61. Academic Press. Amsterdam 2013.
5. Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature*. 2006;443(7113):796-802.
6. Loh KP, Huang SH, De Silva R, Tan BK, Zhu YZ. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res*. 2006;3(4):327-37.
7. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997;91(4):443-6.
8. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25130-8.
9. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Genes Dev*. 1998;12(2):149-62.
10. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(4):558-63.
11. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412(6842):95-9.
12. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395-419.
13. Webster KA, Graham RM, Thompson JW, Spiga MG, Frazier DP, Wilson A, et al. Redox stress and the contributions of BH3-only proteins to infarction. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1667-76.
14. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 2002;111(3):331-42.
15. Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M, Hermann DM. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J*. 2005;19(14):2026-8.

16. Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, et al. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1123:197-212.
17. Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma.* 2000;17(10):811-29.
18. Rohn TT, Head E, Su JH, Anderson AJ, Bahr BA, Cotman CW, et al. Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2001;158(1):189-98.
19. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2875-80.
20. Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med.* 1999;5(8):943-6.
21. Gillardon F, Bottiger B, Schmitz B, Zimmermann M, Hossmann KA. Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997;50(1-2):16-22.
22. Bottiger BW, Teschendorf P, Krumnikl JJ, Vogel P, Galmbacher R, Schmitz B, et al. Global cerebral ischemia due to cardiocirculatory arrest in mice causes neuronal degeneration and early induction of transcription factor genes in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;65(2):135-42.
23. Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci.* 1998;156(2):119-32.
24. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, et al. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* 2006;273(10):2077-99.
25. Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787(11):1395-401.
26. Szabo I, Bernardi P, Zoratti M. Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem.* 1992;267(5):2940-6.
27. Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM, editors. The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp.* 1999;66:167-79.
28. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 2004;427(6973):461-5.
29. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* 2005;280(19):18558-61.
30. Siemen D, Ziemer M. What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not? *IUBMB Life.* 2013;65(3):255-62.

31. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blalchy-Dyson E, Di Lisa F, et al. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *Febs Journal*. 2006;273(10):2077-99.
32. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol*. 2013;4:95.
33. Strauss M, Hofhaus G, Schroder RR, Kuhlbrandt W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J*. 2008;27(7):1154-60.
34. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):5887-92.
35. Johnson KM, Chen X, Boitano A, Swenson L, Pipari AW, Jr., Glick GD. Identification and validation of the mitochondrial F1F0-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. *Chem Biol*. 2005;12(4):485-96.
36. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, et al. Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem*. 2009;284(49):33982-8.
37. Baker LA, Watt IN, Runswick MJ, Walker JE, Rubinstein JL. Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(29):11675-80.
38. Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12030-4.
39. Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 1994;26(5):509-17.
40. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1127-55.
41. Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2571-5.
42. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*. 2000;192(7):1001-14.
43. Honda HM, Ping P. Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2006;20(6):425-32.
44. Bopassa JC, Michel P, Gateau-Roesch O, Ovize M, Ferrera R. Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2750-5.
45. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 2004;427(6972):360-4.

46. Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science*. 2009;326(5949):144-7.
47. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C817-33.
48. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*. 1976;251(16):5069-77.
49. Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*. 1993;32(16):4461-5.
50. Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem*. 1992;267(5):2934-9.
51. Abramov AY, Fraley C, Diao CT, Winkfein R, Colicos MA, Duchen MR, et al. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18091-6.
52. Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem*. 2008;283(39):26307-11.
53. Varanyuwatana P, Halestrap AP. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*. 2012;12(1):120-5.
54. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem*. 1992;267(13):8834-9.
55. Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem*. 1996;271(12):6746-51.
56. Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem*. 1989;264(14):7826-30.
57. Gieseler A, Schultze AT, Kupsch K, Haroon MF, Wolf G, Siemen D, et al. Inhibitory modulation of the mitochondrial permeability transition by minocycline. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(5):888-96.
58. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*. 2002;417(6884):74-8.
59. Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J*. 2004;18(7):869-71.
60. Sayeed I, Parvez S, Winkler-Stuck K, Seitz G, Trieu I, Wallesch CW, et al. Patch clamp reveals powerful blockade of the mitochondrial permeability transition pore by the D2-receptor agonist pramipexole. *FASEB J*. 2006;20(3):556-8.

61. Parvez S, Winkler-Stuck K, Hertel S, Schonfeld P, Siemen D. The dopamine-D2-receptor agonist ropinirole dose-dependently blocks the Ca<sup>2+</sup>-triggered permeability transition of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):1245-50.
62. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1986;261(7):3116-21.
63. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol*. 2007;78(3):183-205.
64. Lu X, Gross AW, Lodish HF. Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem*. 2006;281(11):7002-11.
65. Syed RS, Reid SW, Li C, Cheetham JC, Aoki KH, Liu B, et al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature*. 1998;395(6701):511-6.
66. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res*. 1999;253(1):143-56.
67. Chen C, Sytkowski AJ. Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38518-26.
68. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*. 1990;248(4953):378-81.
69. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood*. 1991;77(3):419-34.
70. Krzyzanski W, Wyska E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of erythropoietin receptor in healthy volunteers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008;377(4-6):637-45.
71. Allegra A, Buemi M, Corica F, Aloisi C, Frisina N. Erythropoietin administration induces an increase of serum levels of soluble E-selectin and soluble intercellular adhesion molecule 1. *Nephron*. 1999;82(4):361-2.
72. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*. 1994;269(30):19488-93.
73. Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med*. 2008;264(5):405-32.
74. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(4):386-92.
75. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(6):643-51.
76. Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M, Roberts ML, et al. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(16):6185-90.
77. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):1-8.

78. Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, Brines M. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep*. 2003;2(6):465-70.
79. Boesch S, Sturm B, Hering S, Scheiber-Mojdehkar B, Steinkellner H, Goldenberg H, et al. Neurological effects of recombinant human erythropoietin in Friedreich's ataxia: a clinical pilot trial. *Mov Disord*. 2008;23(13):1940-4.
80. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(41):14907-12.
81. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):2115-24.
82. Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX, Nakata K, Ma YJ, et al. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res*. 2002;67(6):795-803.
83. Fu ZQ, Shao QL, Shen JL, Zhang YJ, Zhao XX, Yao L. Effect of carbamylated erythropoietin on major histocompatibility complex expression and neural differentiation of human neural stem cells. *J Neuroimmunol*. 2010;221(1-2):15-24.
84. Um M, Lodish HF. Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways. *J Biol Chem*. 2006;281(9):5648-56.
85. Su KH, Shyue SK, Kou YR, Ching LC, Chiang AN, Yu YB, et al. beta Common receptor integrates the erythropoietin signaling in activation of endothelial nitric oxide synthase. *J Cell Physiol*. 2011;226(12):3330-9.
86. Baker JE, Kozik D, Hsu AK, Fu X, Tweddell JS, Gross GJ. Darbepoetin alfa protects the rat heart against infarction: dose-response, phase of action, and mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49(6):337-45.
87. Juhaszova M, Zorov DB, Kim S-H, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. 2004;113(11):1535-49.
88. Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 2000;406(6791):86-90.
89. Brines M, Cerami A. The receptor that tames the innate immune response. *Mol Med*. 2012;18:486-96.
90. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*. 2003;198(6):971-5.
91. Theriault P, Le Behot A, ElAli A, Rivest S. Sub-acute systemic erythropoietin administration reduces ischemic brain injury in an age-dependent manner. *Oncotarget*. 2016;7(24):35552-61.
92. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*. 2002;8(8):495-505.

93. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol.* 2006;59(3):467-77.
94. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke.* 2009;40(12):e647-56.
95. Corwin HL, Gettinger A, Fabian TC, May A, Pearl RG, Heard S, et al. Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. *N Engl J Med.* 2007;357(10):965-76.
96. Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AF, de Boer HC, et al. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006;20(2):135-41.
97. Pessoa FG, Mady C, Fonseca KCB, Oliveira-Fonoff AM, Salemi VMC, Jordao MR, et al. Erythropoietin reduces collagen deposition after myocardial infarction but does not improve cardiac function. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017.
98. Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood.* 1989;73(1):84-9.
99. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(11):6741-6.
100. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science.* 2004;305(5681):239-42.
101. Kirkeby A, Torup L, Bochsén L, Kjalke M, Abel K, Theilgaard-Monch K, et al. High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost.* 2008;99(4):720-8.
102. Coleman TR, Westenfelder C, Togel FE, Yang Y, Hu Z, Swenson L, et al. Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(15):5965-70.
103. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4635-40.
104. Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(31):10925-30.
105. Dahan A, Dunne A, Swartjes M, Proto PL, Heij L, Vogels O, et al. ARA 290 improves symptoms in patients with sarcoidosis-associated small nerve fiber loss and increases corneal nerve fiber density. *Mol Med.* 2013;19:334-45.
106. Brines M, Dunne AN, van Velzen M, Proto PL, Ostenson CG, Kirk RI, et al. ARA 290, a nonerythropoietic peptide engineered from erythropoietin, improves metabolic control and neuropathic symptoms in patients with type 2 diabetes. *Mol Med.* 2014;20:658-66.
107. WHO: International Nonproprietary Names (INN) for Biological and Biotechnological Substances (a review). p 19. WHO Document Production Services. Geneva Switzerland 2016.



108. Syryamina VN, De Zotti M, Toniolo C, Formaggio F, Dzuba SA. Alamethicin self-assembling in lipid membranes: concentration dependence from pulsed EPR of spin labels. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(5):3592-601.
109. Ernster L, Dallner G, Azzone GF. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. *J Biol Chem*. 1963;238(3):1124-31.
110. Fei MJ, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Yamaguchi H, Tsukihara T, et al. X-ray structure of azide-bound fully oxidized cytochrome c oxidase from bovine heart at 2.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2000;56(Pt 5):529-35.
111. Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*. 1990;258(5 Pt 1):C755-86.
112. Colonna R, Massari S, Azzone GF. The problem of cation-binding sites in the energized membrane of intact mitochondria. *Eur J Biochem*. 1973;34(3):577-85.
113. Gnaiger E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol*. 2001;128(3):277-97.
114. Panov AV, Andreeva L, Greenamyre JT. Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 2004;424(1):44-52.
115. Zhang H, Ge Z, Tang S, Meng R, Bi Y, Zhu D. Erythropoietin ameliorates PA-induced insulin resistance through the IRS/AKT/FOXO1 and GSK-3 $\beta$  signaling pathway, and inhibits the inflammatory response in HepG2 cells. *Mol Med Rep*. 2017;16(2):2295-301.
116. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol*. 2001;101(3):271-6.
117. Eckardt KU. Erythropoietin production in liver and kidneys. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1996;5(1):28-34.
118. Bonnas C, Wustefeld L, Winkler D, Kronstein-Wiedemann R, Dere E, Specht K, et al. EV-3, an endogenous human erythropoietin isoform with distinct functional relevance. *Sci Rep*. 2017;7(1):3684.
119. Locatelli F, Del Vecchio L, Pozzoni P. Pure red-cell aplasia "epidemic"--mystery completely revealed? *Perit Dial Int*. 2007;27 Suppl 2:S303-7.
120. Worthmann H, Martens-Lobenhoffer J, Joumaah M, Li N, Lichtinghagen R, Hecker H, et al. Asymmetric dimethylarginine in response to recombinant tissue-type plasminogen activator and erythropoietin in acute stroke. *Stroke*. 2013;44(8):2128-33.
121. Tsai TH, Lu CH, Wallace CG, Chang WN, Chen SF, Huang CR, et al. Erythropoietin improves long-term neurological outcome in acute ischemic stroke patients: a randomized, prospective, placebo-controlled clinical trial. *Crit Care*. 2015;19:49.
122. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015;519(7541):92-6.
123. Viennois E, Merlin D, Gewirtz AT, Chassaing B. Dietary Emulsifier-Induced Low-Grade Inflammation Promotes Colon Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2017;77(1):27-40.

124. Steele RH, Limaye S, Cleland B, Chow J, Suranyi MG. Hypersensitivity reactions to the polysorbate contained in recombinant erythropoietin and darbepoietin. *Nephrology (Carlton)*. 2005;10(3):317-20.
125. Hansson MJ, Persson T, Friberg H, Keep MF, Rees A, Wieloch T, et al. Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. *Brain Res*. 2003;960(1-2):99-111.
126. Yan M, Zhu P, Liu HM, Zhang HT, Liu L. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(16):2352-6.
127. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10659-64.
128. Vatsveen TK, Sponaas AM, Tian E, Zhang Q, Misund K, Sundan A, et al. Erythropoietin (EPO)-receptor signaling induces cell death of primary myeloma cells in vitro. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):75.
129. Berman SB, Watkins SC, Hastings TG. Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria. *Exp Neurol*. 2000;164(2):415-25.
130. Kupsch K, Hertel S, Kreutzmann P, Wolf G, Wallesch CW, Siemen D, et al. Impairment of mitochondrial function by minocycline. *FEBS J*. 2009;276(6):1729-38.
131. Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, et al. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H748-55.

## **10. Danksagung**

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## Ehrenerklärung

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

„Kann die gewebeprotective Wirkung von Erythropoetin durch die Blockade der *permeability transition pore* erklärt werden?“

im Neurochemischen Labor der Klinik für Neurologie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. Siemen

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

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

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

Halle (Saale), den 07.03.19

Maire Käding

## **Darstellung des Bildungsweges**

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.