

Aus der Universitätsklinik für Neurologie  
der medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Substratverwertung in Mitochondrien verschiedener ZNS-  
Regionen. Untersuchungen an normalen Ratten und Mäusen.

**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 Niki Karavasili  
aus Cholargos, Griechenland  
Magdeburg 2020



### **Bibliographische Beschreibung:**

Karavasili, Niki: Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Substratverwertung in Mitochondrien verschiedener ZNS-Regionen. Untersuchungen an normalen Ratten und Mäusen. - 2020. - 80 Bl., 27 Abb., 5 Tab., 1 Anl.

### **Kurzreferat:**

Im Gegensatz zur klassischen Hypothese, nach der zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  von den Mitochondrien aufgenommen werden muss, um die Substratoxidation zu aktivieren, fanden Gellerich et al. (2013) [16], dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der mitochondrialen Substratversorgung extramitochondrial über den Malat-Aspartat-Shuttle (MAS) erfolgt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieses Konzept an Mitochondrien aus neun verschiedenen ZNS-Regionen von Ratten und Mäusen durch respirometrische Messungen unterschiedlicher Komplexität überprüft werden. Aus Vorversuchen wurden Cerebellum und Hirnstamm als Modellregionen mit den größten funktionellen Unterschieden ausgewählt. Die Pyruvatatmung der Mitochondrien aller untersuchter ZNS-Regionen war bereits ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz nahezu maximal. Dagegen war die Glutamat/Malat-Atmung von cerebellären Mitochondrien deutlich durch  $\text{Ca}^{2+}$  stimulierbar. Hirnstammmitochondrien ließen sich jedoch kaum durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivieren, da sie bereits über eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Glutamat/Malat-Atmung verfügten. Mit einem komplexeren MAS-Modell ließ sich nachweisen, dass beide Modellregionen ähnlich hohe MAS-Aktivitäten besitzen. Mit Hilfe von Rutheniumrot (Hemmstoff des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters) konnte gezeigt werden, dass der MAS und die mit ihm metabolisch gekoppelte Pyruvatbildung durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  gesteuert werden, welches nicht in die Mitochondrien gelangen muss, um bis zu 85% der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) regulieren zu können (Mitochondriales Gaspedal) [16]. Aus diesem Grund könnten Hemmstoffe der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme zur Prophylaxe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden, was früher aufgrund vermuteter Beeinträchtigungen der Regulation der OXPHOS nicht in Betracht gezogen werden konnte.

### **Schlüsselwörter:**

ZNS-Mitochondrien, Malat-Aspartat-Shuttle, Pyruvat, Mitochondriales Gaspedal, mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung, zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Das mitochondriale Gaspedal ( $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Pyruvatbildung durch den vollständigen MAS) .....	3
1.2 Die Oxidation von zytosolischem NADH mit Hilfe der NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase .....	6
1.3 Pyruvatstoffwechsel .....	7
1.4 Glutamatstoffwechsel .....	8
1.5 Regionale Unterschiede der Mitochondrienfunktion .....	10
1.5.1 Mitochondriale Unterschiede zwischen Neuronen und Nichtneuronen .....	11
1.5.2 Regionale Variationen in der Substrat-Verwertung .....	11
1.6 Ziele und Fragestellung .....	12
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Versuchstiere .....	14
2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien .....	15
2.3 Geräte und Gebrauchsmaterialien .....	16
2.4 Herstellung von Medien und Pufferlösungen .....	17
2.4.1 Inkubationsmedien für Mitochondrien (BIM-0; BIM-1000) .....	17
2.4.2 Präparationsmedien für Mitochondrien (MSE-A; MSE-B) .....	18
2.5 Präparation der ZNS-Regionen .....	18
2.5.1 Betäubung und Dekapitation der Versuchstiere .....	18
2.5.2 Rückenmark .....	18
2.5.3 Gesamthirn .....	18
2.5.4 Cerebellum .....	19
2.5.5 Hirnstamm .....	19
2.5.6 Cortex .....	20
2.5.7 Corpus callosum .....	20

---

2.5.8	Substantia nigra .....	21
2.5.9	Hippocampus .....	22
2.5.10	Striatum.....	22
2.6	Isolation der Mitochondrien.....	24
2.7	Proteinbestimmung .....	24
2.8	Citratsynthase-Aktivität .....	24
2.9	Respirometrie .....	25
2.10	Statistische Auswertung.....	26
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Citratsynthase-Aktivität .....	27
3.2	Regionale Unterschiede in der Mitochondrienfunktion.....	28
3.3	Regionale Unterschiede in der Ca <sup>2+</sup> -Aktivierung der Glutamat- und Pyruvat-abhängigen Atmung.....	32
3.4	Die Ca <sup>2+</sup> -abhängige Pyruvatbereitstellung durch den vollständigen Malat-Aspartat-Shuttle .....	44
3.5	Regionale Unterschiede in der Vulnerabilität der Mitochondrien gegenüber Ca <sup>2+</sup> -Stress .....	47
4	Diskussion.....	51
4.1	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> auf die mitochondriale Pyruvatatmung .....	52
4.2	Einfluss von Ca <sup>2+</sup> auf die mitochondriale Glutamat/Malat-Atmung.....	54
4.3	Gleiche Ausprägung der Gaspedal-abhängigen Atmung im Hirnstamm und im Cerebellum.....	55
4.4	Ca <sup>2+</sup> -Stress .....	56
4.5	Schlussfolgerung .....	58
5	Zusammenfassung.....	59
6	Literaturverzeichnis .....	61
7	Danksagung.....	66
8	Ehrenerklärung.....	68
9	Lebenslauf.....	69
10	Anlagen.....	70
10.1	Sachkundenachweis für das Töten von Versuchstieren .....	70

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vielfältige Zellfunktionen, die durch die zytosolische $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesteuert werden. [11].....	2
Abbildung 2: Metabolisches Schema der Pyruvatbildung aus Glucose und Laktat mit Hilfe des MAS und des G3PS (Mitochondriales Gaspedal).....	4
Abbildung 3: Vergleich der mitochondrialen $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung von Wild Typ (WT) und MCU-KO Mitochondrien. [66].....	5
Abbildung 4: Die Rotenon-insensitive NADH-Cytochrom-C-Oxidoreduktase. [1] .....	6
Abbildung 5: Die drei Aufnahmemechanismen von Glutamat.....	9
Abbildung 6: Mediane Sagittalansicht des Rattenhirns.....	20
Abbildung 7: Coronaransicht des Rattenhirns in der Mitte der Colliculi superiores. [53] .....	21
Abbildung 8: Coronaransicht des Rattenhirns rostral der Colliculi superiors. [53] ....	22
Abbildung 9: Coronaransicht des Rattenhirns kurz vor dem Beginn des Corpus Callosum. [53].....	23
Abbildung 10: Coronaransicht des Rattenhirns zwischen dem ersten und zweiten Drittel des Corpus Callosum. [53] .....	23
Abbildung 11: Die Citratsynthase-Aktivität als Maß für den Mitochondriengehalt in den untersuchten ZNS-Regionen von Ratte und Maus. ....	28
Abbildung 12: Respirometrische Charakterisierung funktioneller Eigenschaften von Mitochondrien aus Cerebellum und Hirnstamm von gesunden Ratten durch den EGTA-Ansatz.....	29
Abbildung 13: Komplex-abhängige Atmungsraten von isolierten Mitochondrien aus in den untersuchten verschiedenen ZNS-Regionen von Ratte und Maus. ....	30
Abbildung 14: Regionaler Vergleich der G3Ph-Ratios und des Pyruvat-Index. ....	32
Abbildung 15: Regionalspezifische Unterschiede bei der $\text{Ca}^{2+}$ -Titration der Glutamat/Malat-Atmung.....	34
Abbildung 16: Statistische Darstellung der Glutamat/Malat- $\text{Ca}^{2+}$ -Titration $\pm$ Rutheniumrot von Hirnstamm und Cerebellum (Ratte) im Vergleich. ....	35
Abbildung 17: Regionalspezifische Unterschiede bei der $\text{Ca}^{2+}$ -Titration der Pyruvat/Malat-Atmung. ....	36
Abbildung 18: Statistische Darstellung der Pyruvat/Malat- $\text{Ca}^{2+}$ -Titration $\pm$ Rutheniumrot von Hirnstamm und Cerebellum (Ratte) im Vergleich. ....	37
Abbildung 19: Statistische Darstellung der Pyruvat-Titration mit und ohne $\text{Ca}^{2+}$ und RR in Ratte und Maus im Vergleich. Fehlender $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluss auf die Pyruvat-abhängige Atmung. ....	38
Abbildung 20: Statistische Darstellung der Glutamat-Titration mit und ohne $\text{Ca}^{2+}$ und RR in Ratte und Maus im Vergleich.....	40
Abbildung 21: Darstellung der $\text{Ca}^{2+}$ -Ratio in Anwesenheit von Glutamat/Malat bzw. Pyruvat/Malat.....	42

---

Abbildung 22: Regionaler Vergleich der G3P-stimulierten Atmung mit der $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung von Mitochondrien aus den untersuchten ZNS-Regionen von Ratte und Maus.....	43
Abbildung 23: Schematische Darstellung des vollständigen MAS (Mode 3; s. Tabelle 3). .....	45
Abbildung 24: Das vollständig rekonstituierte MAS-Modell (Mode 3; Tabelle 3) ermöglicht eine $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierbare Veratmung von Pyruvat, das dem Ansatz nicht zugefügt werden muss, sondern direkt aus Laktat gebildet wird. ....	46
Abbildung 25: Aufzeichnung typischer Oxygraphmessungen zur Darstellung des $\text{Ca}^{2+}$ -Einflusses auf die Mitochondrienfunktion. Untersuchungen an Ratten. ....	48
Abbildung 26: Der Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ -Stress auf die Funktion von Mitochondrien isoliert aus den Modellregionen Hirnstamm und Cerebellum der Ratte.....	49
Abbildung 27: Auswirkungen von $\text{Ca}^{2+}$ -Stress auf den Respiratorischen Kontrollindex (RCI) der aktivierten Atmung von Mitochondrien der untersuchten ZNS-Regionen..	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	15
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 3: Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen MAS-Modelle mit steigender Komplexität (s. auch Abbildung 23 und Abbildung 24).....	33
Tabelle 4: Übersicht über die durchschnittlichen Maximalwerte der Pyruvattitration.	39
Tabelle 5: Übersicht über die durchschnittlichen Maximalwerte der Glutamattitration. .....	41



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

ADP	Adenosindiphosphat
AGC	Aspartat-Glutamat-Carrier
ALT	Alanin-Aminotransferase
AOA	Aminooxyacetat
ATP	Adenosintriphosphat
BIM	Brain incubation medium
GH	Gesamthirn
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CB	Cerebellum bzw. Kleinhirn
CB-M	Cerebellum Maus
CC	Corpus callosum
COX	Cytochrom-c-Oxidase
Cyt C	Cytochrom c
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FADH	Flavinadenindinukleotid
G/M	Glutamat/Malat
Hip	Hippocampus
HS	Hirnstamm
HS-M	Hirnstamm Maus
MAS	Malat-Aspartat-Shuttle
MCU	mitochondrialer Ca <sup>2+</sup> -Uniporter
Mito	Mitochondrien
MOPS	3-(4-Morpholino)propansulfonsäure

---

MSE	Mannitol-Saccharose-EGTA-Medium
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OA	Oxalacetat
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDH	Pyruvatdehydrogenase
Pyr	Pyruvat
RM	Rückenmark
RR	Rutheniumrot
SN	Substantia Nigra
Str	Striatum
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
Tris-Puffer	Trisaminomethan-Puffer
UpM	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentralnervensystem

---

# 1 Einleitung

Praktisch alle energieabhängigen Reaktionen in unseren Körperzellen werden durch die energieliefernde Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat angetrieben. Aufgabe der Mitochondrien ist es, ATP mittels der oxidativen Phosphorylierung kontinuierlich zu regenerieren. Die Energie für diesen Prozess stammt letztlich aus der Reaktion von Sauerstoff mit Wasserstoff zu Wasser (Knallgasreaktion). Jedoch im Gegensatz zu der reinen Knallgasreaktion, ist der in den Mitochondrien verwendete Wasserstoff an Substrate (Fettsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydrate) gebunden. Die Regeneration von ATP erfolgt mit ständig wechselnder und auf die physiologischen Aufgaben (Ruhe, Schlaf, Kampf-Flucht-Modus etc.) optimierter Geschwindigkeit. Aus diesem Grund muss die Substratbereitstellung diesen Erfordernissen angepasst werden. Dabei wären sowohl Substratbegrenzung als auch Substratüberschuss nachteilig. Wie diese optimal regulierte Substratbereitstellung realisiert wird, steht seit 70 Jahren im Zentrum der bioenergetischen Forschung.

Wie Abbildung 1 veranschaulicht, sind die Wechselwirkungen von  $\text{Ca}^{2+}$  mit den Zellbestandteilen vielfältig und teilweise noch nicht vollständig verstanden. Die physiologische Ruhekonzentration des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  liegt bei etwa 100 nM und kann bei Aktivierung bis zu 1  $\mu\text{M}$  ansteigen [39, 16]. Übermäßig erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (>1,5  $\mu\text{M}$ ) führen infolge unkontrollierter mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme zu irreversibler Schädigung der Mitochondrien. Infolge der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung wird innerhalb des Matrixraumes eine Cyclophilin-D-Isomerase aktiviert, welche die  $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$  irreversibel in eine sich öffnende Pore umwandelt. Das führt wiederum über den Zusammenbruch aller Ionen- und Substratgradienten zum Funktionsverlust der betroffenen Mitochondrien und somit zum Zelltod [6].



der OXPHOS bezeichnet. Darüber hinaus soll  $\text{Ca}^{2+}$  auch die Aktivität der  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase steigern [3].

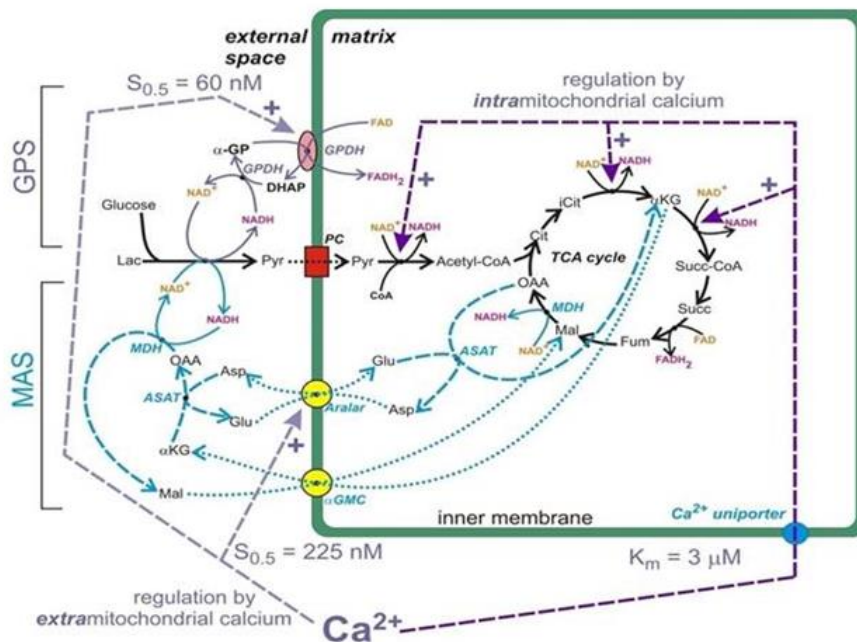
Die klassische Hypothese hat jedoch gravierende Schwächen: Es wird nur erklärt, dass die Geschwindigkeit der intramitochondrialen Substratoxidation durch  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht werden kann, was aber voraussetzt, dass sich ständig genügend Substrate in den Mitochondrien befinden bzw. dass immer genügend Substrate schnell bereitgestellt werden. Weiterhin zeigen Computersimulationen, dass die Aktivierung der Matrix-Dehydrogenasen nicht ausreicht, um die Gesamtleistung der OXPHOS adäquat zu erhöhen, sondern dass zusätzliche Aktivierungsschritte erforderlich sind [30]. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die Dehydrogenasen bereits ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung eine hohe Aktivität besitzen. Demnach gibt es zwar den klassischen Mechanismus, jedoch ist sein Ausmaß wahrscheinlich viel geringer als im Allgemeinen angenommen wird [67].

Wenn der klassische Mechanismus alleinig für die Regulation der Substratversorgung verantwortlich wäre, dann sollte eine gentechnische Deaktivierung (Knock-out) des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters (MCU-KO) die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unmöglich machen und dadurch eine intramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation der Substratbereitstellung verhindern. Kürzlich erzeugte MCU-KO Mäuse sind jedoch überraschenderweise fast normal lebensfähig [47, 22]. Sie haben normale Lern- und Merkfähigkeit, sind etwas kleiner als normal, weisen jedoch eine signifikant verminderte Arbeitsfähigkeit bei hoher Belastung auf [49, 58, 27]. Demnach kann der klassische Mechanismus nicht oder nur in sehr geringem Maße für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der oxidativen Phosphorylierung verantwortlich sein [68]. Dies spricht dafür, dass es noch andere Mechanismen geben muss, die die mitochondriale Substratversorgung und Leistung regeln.

### 1.1 Das mitochondriale Gaspedal ( $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Pyruvatbildung durch den vollständigen MAS)

Es gibt zwei Enzyme an der mitochondrialen Oberfläche, deren Aktivität durch die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert wird: der mitochondriale Glutamat-Aspartat-Carrier (Aralar) und die mitochondriale Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase [62]. Wie in Abbildung 2 dargestellt sind beide Enzyme zentraler Bestandteil des Malat-Aspartat- (MAS) bzw.  $\alpha$ -Glycerol-3-Phosphat-Shuttles (G3PS). Beide Shuttlesysteme

oxidieren zytosolisches NADH zu NAD<sup>+</sup> und transportieren die dabei entstehenden reduzierenden Äquivalente (Hydridanionen) in die Mitochondrien [35, 48, 62]. Das entstandene NAD<sup>+</sup> ermöglicht die oxidative Pyruvatbildung aus Laktat bzw. Glucose, die sonst nicht möglich wäre. Beide NADH-oxidierenden Shuttles sind somit über das Redox-Paar NADH/NAD<sup>+</sup> untrennbar mit der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Pyruvatbildung verknüpft und sollten deshalb als metabolische Einheit (vollständiger MAS bzw. G3PS) betrachtet werden [17] (Abbildung 2), was aber häufig übersehen wird [4, 9].



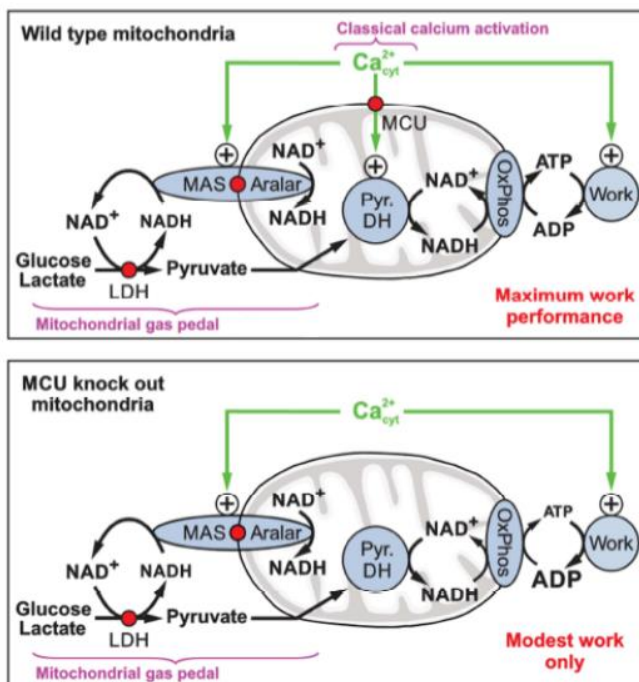
**Abbildung 2: Metabolisches Schema der Pyruvatbildung aus Glucose und Laktat mit Hilfe des MAS und des G3PS (Mitochondriales Gaspedal).**

Die Pyruvatbildung aus Laktat (bzw. aus Glucose) benötigt NAD<sup>+</sup>. Dieses muss ständig durch den MAS oder GPS bereitgestellt werden. Allerdings können die beiden Shuttles nur dann NADH oxidieren, wenn dieses über die Pyruvatbildung bereitgestellt wird. Beide Shuttles werden durch Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen (60 nM, bzw. 225 nM) aktiviert, die weit unterhalb der Konzentration liegen, bei der der Ca<sup>2+</sup>-Uniporter Ca<sup>2+</sup> in die Mitochondrien transportiert (500 nM). Man beachte, dass die alleinige Gabe von Glutamat und Malat bereits die mitochondrialen Reaktionen des MAS (ohne Pyruvatbildung) simuliert. GPS, Glycerol-3-Phosphat-Shuttle; MAS, Malat-Aspartat-Shuttle; PC, Pyruvat-Carrier; αKG, α-Ketoglutarat; OAA, Oxalacetat; TCA, Citratzyklus; α-GP, α-Glycerolphosphat; Mal, Malat; Glu, Glutamat; DHAP, Dihydroxyacetonphosphat; MDH, Malat-Dehydrogenase; Asp, Aspartat; Lac, Laktat; Pyr, Pyruvat; Cit, Citrat; iCit, Isocitrat; Fum, Fumarat; GPDH, Glycerolphosphat-Dehydrogenase; Succ, Succinat.

Da beide Shuttles durch zytosolisches Ca<sup>2+</sup> bei Konzentrationen unter 500 nM Ca<sup>2+</sup> aktiviert werden [16], können sie die Pyruvatbereitstellung für die OXPHOS regulieren, ohne dass Ca<sup>2+</sup> über den MCU in die Mitochondrien gelangen muss.

Dieser von Gellerich et al. [16] gefundene Aktivierungsmechanismus wurde als mitochondriales Gaspedal bezeichnet und erweitert somit das klassische Konzept.

Erst wenn das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen von über 400-500 nM erreicht, kann es über den MCU in die Mitochondrien gelangen und die Matrix-Dehydrogenasen aktivieren [7, 16]. Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, kann trotz vollständiger Hemmung des MCU über den Gaspedalmechanismus 85% der maximal möglichen Geschwindigkeit der OXPHOS von ungehemmten Mitochondrien (100%) erreicht werden [67]. Demnach ermöglicht der klassische Aktivierungsmechanismus nur eine Steigerung von 85 auf 100%. Diese Befunde können erklären, warum MCU-KO-Mäuse nahezu normal leben können, aber wahrnehmbare Einschränkungen im Bereich maximaler Muskelarbeit aufweisen [67].

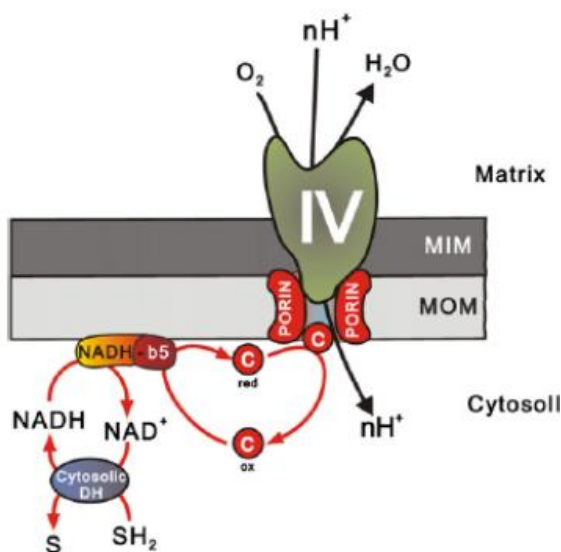


**Abbildung 3: Vergleich der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung von Wild Typ (WT) und MCU-KO Mitochondrien. [67]**

Bei WT-Mitochondrien übernimmt der Gaspedal-Mechanismus 85% der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung während der klassische die restliche Aktivierung von 85 bis 100% realisiert, wodurch maximale Arbeitsleistungen erbracht werden können. Im Gegensatz dazu verfügen die MCU-KO Mitochondrien nur über das mitochondriale Gaspedal, was Arbeitsleistungen bis zu 85% erlaubt und den Tieren ein fast normales Leben, jedoch ohne Spitzenbelastungen ermöglicht. LDH, Laktat-Dehydrogenase; Pyr-DH, Pyruvat-Dehydrogenase.

## 1.2 Die Oxidation von zytosolischem NADH mit Hilfe der NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase

Alternativ zum MAS und dem G3PS gibt es Hinweise auf einen weiteren Mechanismus, der zytosolisches NADH mit Hilfe einer NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase oxidiert und somit die oxidative Pyruvatbildung ermöglichen könnte. Die Komponenten dieses Systems umfassen zytosolisches Cytochrom-c, Porin und die Cytochrom-c-Oxidase und befinden sich an Stellen, an denen die äußere Mitochondrienmembran mit der Inneren in Kontakt kommt („respiratory contact sites“). Das reduzierte Cytochrom-c wird unter Wasserbildung oxidiert, wobei die Cytochromoxidase als Protonenpumpe agiert und die aus dieser Reaktion stammende Energie zur ATP-Synthese genutzt werden kann [1]. Dieser Mechanismus wird durch Cyanid oder Azid (Hemmstoffe der COX) beeinflusst, jedoch nicht durch Rotenon, weshalb das Enzym auch Rotenon-insensitive NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase genannt wurde. Dieser Mechanismus ist bislang nur in Lebermitochondrien nachgewiesen worden [1]. Dennoch wurde seine Existenz vor Jahren auch für Skelettmuskelmitochondrien [55] postuliert.



**Abbildung 4: Die Rotenon-insensitive NADH-Cytochrom-C-Oxidoreduktase. [1]**

Dieser alternative Mechanismus ermöglicht die Oxidation des zytosolischen NADH, welches notwendig für die Reduktion von extramitochondrialem Cytochrom c ist. Anschließend wird das reduzierte Cytochrom c durch die Cytochromoxidase wieder oxidiert. Bei diesem Schritt übernimmt die Cytochromoxidase die Funktion einer Protonenpumpe, wobei die aus dieser Reaktion stammende Energie zur ATP-Synthese genutzt werden kann.



### 1.3 Pyruvatstoffwechsel

Für die Mitochondrien des ZNS ist Pyruvat ein essenzielles Substrat und die oxidative Bildung aus seinen Vorstufen Laktat und Glucose erfordert, wie oben erwähnt, funktionierende MAS oder G3PS. Die zelluläre Pyruvatkonzentration liegt im Regelbereich der Michaeliskonstante der OXPHOS für Pyruvat (50 - 100  $\mu\text{M}$ ) [51, 64]. Im Zytosol von Zellkulturen soll sie sogar kleiner als 10  $\mu\text{M}$  Pyruvat sein [61]. Sie ist somit um mindestens eine Größenordnung kleiner als die Michaeliskonstante ( $K_M$ ) anderer gängiger Substrate [16]. Diese Konzentration ist so gering, dass sie ohne Nachbildung nur für einige Sekunden eine erhöhte Atmungsgeschwindigkeit gestattet. Darüber hinaus ist die  $V_{\text{max}}$  der Pyruvat-Oxidation in Hirnmitochondrien um mindestens 30% größer als die von anderen Substraten [16].

Pyruvat wird über den Pyruvat-Carrier elektrogen im Cotransport mit  $\text{H}^+$  ins Mitochondrium transportiert, was den Transport auch gegen seinen Konzentrationsgradienten ermöglicht [48]. Die niedrige  $K_M$  erlaubt eine optimale und einfache Regulation der mitochondrialen Pyruvat-Verwertung über seine zytosolische Konzentration. Demzufolge kann Pyruvat schon bei niedrigeren Konzentrationen und schneller als die meisten Substrate von den Mitochondrien metabolisiert werden [16]. Die optimale  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Pyruvatbereitstellung ermöglicht somit kurzfristig abrufbare Spitzenleistungen (z.B. für die Kampf-Flucht-Reaktion). Der mitochondriale Pyruvat-Carrier lässt sich spezifisch mit Hydroxycinnamat hemmen [21, 69], was für den Nachweis der Pyruvatverwertung unter *in vivo*-Bedingungen bedeutsam ist.

Andererseits erlauben die sehr geringen Ruhekonzentrationen von Pyruvat wahrscheinlich ein Umschalten der Mitochondrien in einen Zustand des Substratmangels (State 2, nach Chance und Williams [8]). Dies könnte bei physiologischer Ruhe und Schlaf den Vorteil haben, dass der Reduktionsgrad der Coenzyme in der Atmungskette vermindert ist, was geringeren oxidativen Stress bewirken könnte.

Aufgrund seiner zentralen Stellung im Zwischenstoffwechsel bestehen weitere Möglichkeiten zur Bildung von Pyruvat, wie beispielsweise über die Transaminierung von Alanin und über die Bildung aus Malat, die jedoch bei der Pyruvatbereitstellung als mitochondriales Substrat für die OXPHOS nicht von Bedeutung sind [20].

## 1.4 Glutamatstoffwechsel

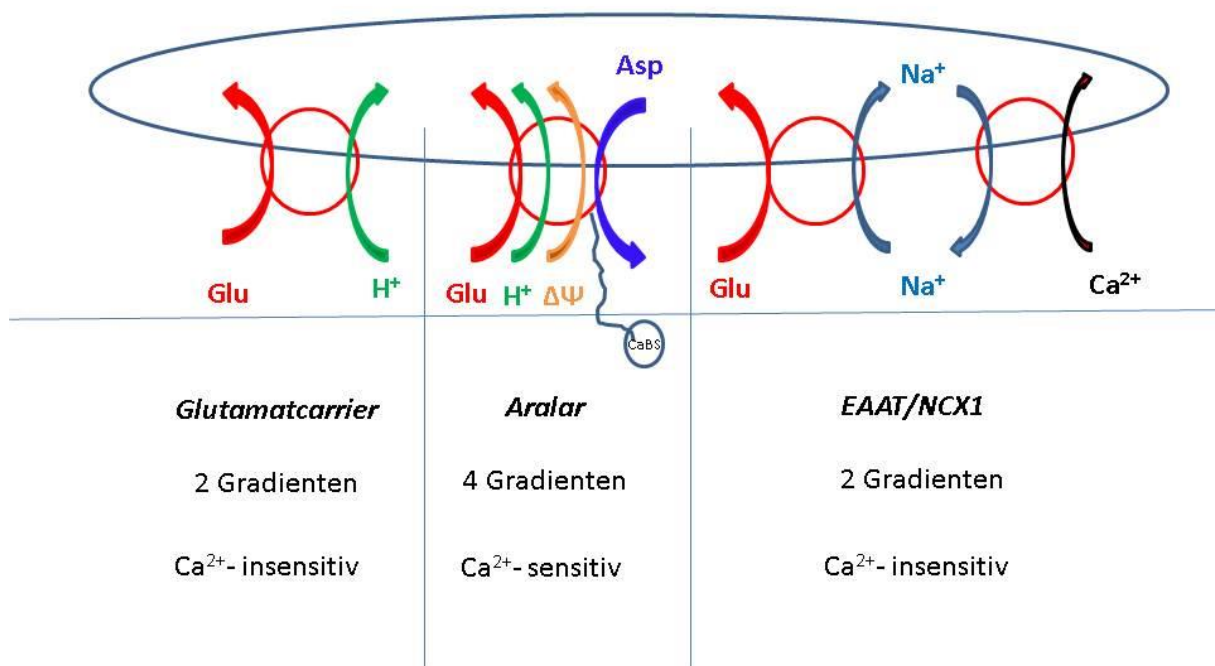
Glutamat ist eins der wichtigsten Substrate im Gehirn. Es dient nicht nur direkt als Neurotransmitter, sondern auch als Präkursor für die GABA-Synthese. Darüber hinaus ist es auch ein zentrales mitochondriales Substrat für die OXPHOS, indem es über die mitochondriale Glutamat-Dehydrogenase zu  $\alpha$ -Ketoglutarat metabolisiert wird. Darüber hinaus ist Glutamat zentrales Substrat des MAS (s. oben).

Glutamat kann über drei Transportmechanismen in die Mitochondrien eingeschleust werden (Abbildung 5) [44]. Der eine ist der Aspartat-Glutamat-Carrier (AGC), der zwei Isoformen hat: Aralar, was hauptsächlich im ZNS exprimiert wird, und Citrin, was vorwiegend in der Leber lokalisiert ist [2]. Im Herzen sind beide Isoformen nachweisbar [62]. Aralar befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und besteht aus einer C-terminalen, transmembranal verlaufenden Domäne und einer N-terminalen Domäne, die eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle besitzt und frei in den Intermembranraum ragt. Diese Bindungsstelle dient zur Regulation der Geschwindigkeit des Carriers durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  [48]. Glutamat kann jedoch nur dann über Aralar in die Mitochondrien gelangen, wenn gleichzeitig Aspartat vom Matrixraum ins Zytosol transportiert wird. Dies ist nur der Fall, wenn das eintretende Glutamat mit Oxalacetat transaminiert werden kann, weshalb auch zusätzlich Malat benötigt wird, um über die Malat-Dehydrogenase Oxalacetat zu produzieren. Bei der Transaminierung entstehen  $\alpha$ -Ketoglutarat und Aspartat, welche ins Zytosol exportiert werden [10]. Bemerkenswert am MAS ist, dass die eben genannten Substrate während der Reaktion nicht verbraucht, sondern ständig regeneriert werden.

Der zweite Aufnahmeweg von Glutamat erfolgt über den Glutamat-Carrier [13], welcher Glutamat im Cotransport mit  $\text{H}^+$  in die Mitochondrien transportiert und nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden kann [48] (Abbildung 5). Dort übernimmt die ausschließlich in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Glutamat-Dehydrogenase die oxidative Desaminierung des Glutamats zu  $\alpha$ -Ketoglutarat.

Ein erst in letzter Zeit vorgeschlagener dritter Aufnahmeweg soll über den Glutamat-Transporter EAAT1 erfolgen, der hauptsächlich in der Zellmembran von Gliazellen lokalisiert ist [36]. Dieses Enzym funktioniert hier als Cotransporter für Glutamat und  $\text{Na}^+$  aus dem extrazellulären Raum in die Zellen (z.B. Astrozyten). Dieser Carrier soll auch in Hirnmitochondrien [40] und Herzmitochondrien [56, 40] vorkommen. Er soll

zusammen mit einem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Transporter (NXC1) einen Enzymkomplex in der mitochondrialen Innenmembran bilden und  $\text{Ca}^{2+}$ -unempfindlich eine mitochondriale Glutamataufnahme ermöglichen. Das von den Mitochondrien aufgenommene  $\text{Na}^+$  wird über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gegen zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  ausgetauscht. Demnach sollte dieser Mechanismus nur dann funktionieren, wenn extramitochondrial sowohl  $\text{Na}^+$  als auch  $\text{Ca}^{2+}$  verfügbar sind.



**Abbildung 5: Die drei Aufnahmemechanismen von Glutamat.**

Die unterschiedliche Anzahl von Transportgradienten bei den drei Glutamataufnahmewegen führt zu einer energetischen Bevorzugung des Aralar-Aufnahmeweges, der zusätzlich noch durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden kann.

Da sich diese drei Glutamataufnahme-Mechanismen sehr voneinander unterscheiden, sollte überlegt werden, ob es Unterschiede in der Transporteffizienz geben könnte. Aralar wird durch die Konzentrationsgradienten der Substrate Glutamat und Aspartat und dem elektrochemischen Protonengradienten  $\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\text{pH} + \Delta\Psi$ , also durch insgesamt 4 Gradienten angetrieben [2]. Im Gegensatz dazu besitzt der Glutamats-Carrier nur zwei Konzentrationsgradienten (Glutamat und  $\Delta\text{pH}$ ) und desgleichen der EAAT/NCX1 Komplex (Glutamat und  $\text{Na}^+$ -Ionen).

Auf diese Weise kann vermutlich sichergestellt werden, dass falls Glutamat bereits über den Glutamats-Carrier und/oder EAAT in die Mitochondrien transportiert wird, ein

durch zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aktiviertes Aralar den mitochondrialen Glutamatstoffwechsel zugunsten der Pyruvatbildung majorisieren kann [67].

## 1.5 Regionale Unterschiede der Mitochondrienfunktion

Unter der Fragestellung, warum verschiedene neurodegenerative Erkrankungen bevorzugt verschiedene ZNS-Regionen befallen [38], wurden die funktionellen Eigenschaften von Mitochondrien verschiedener ZNS-Regionen parallel untersucht. Gizatullina et al. [19] verglichen z.B. die Auswirkungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress ( $20 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) auf die mitochondrialen Atmungsraten verschiedener ZNS-Regionen des Rattenhirns sowie den schützenden Einfluss von Cyclosporin A (CsA). In den Geweben Gesamthirn, Cortex, Striatum, Hippocampus, Cerebellum und S. Nigra fand sich, dass die Glutamat/Malat-Atmung um mehr als die Hälfte gehemmt wurde, während die Succinatatmung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress praktisch nicht verändert wurde. CsA bewirkte einen fast vollständigen Schutz vor  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress. Darüber hinaus verbesserte CsA die funktionellen Eigenschaften unbehandelter Mitochondrien aller Regionen. So stiegen aktive Atmungsraten und die Geschwindigkeit der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme an. Unter Einbeziehung aller untersuchten Parameter ergab sich folgendes Stabilitätsranking  $\text{BM}_{\text{Cerebellum}} > \text{BM}_{\text{Cortex}} > \text{BM}_{\text{Striatum}} > \text{BM}_{\text{S. Nigra}} > \text{BM}_{\text{Hippocampus}}$ , welches auch ähnlich von Friber et al. [14] gefunden wurde:  $\text{BM}_{\text{Cerebellum}} > \text{BM}_{\text{Cortex}} > \text{BM}_{\text{Hippocampus}}$ . Allerdings waren die Stabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Regionen nicht deutlich genug, dass sie den bevorzugten Erstbefall bestimmter Regionen bei neurodegenerativen Erkrankungen erklären konnten.

Bei vergleichenden Untersuchungen von Mitochondrien aus Hirn und Rückenmark fanden Panov et al. [50], dass mit Ausnahme der Succinatatmung, die Glutamat-, Pyruvat- und Ascorbat-abhängigen Atmungsraten unter State-3-Bedingungen (phosphorylierende Atmung) in Hirnmitochondrien größer als in Rückenmarkmitochondrien ist, was wahrscheinlich an den geringeren spezifischen Enzymgehalten liegt. Weiterhin können Rückenmarkmitochondrien deutlich weniger  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen, bevor sie irreversibel durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung geschädigt werden [19]. Darüber hinaus ist der gesamte  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im Rückenmark 8-mal größer als im Gehirn [50]. Umgerechnet können die Hirnmitochondrien einige Male mehr  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen, als sich im Gehirn befindet. Im Gegensatz dazu können die Rückenmarkmitochondrien nur 10-20% des im Rückenmark vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen. Sie haben eine größere Succinat-abhängige State-4-Atmung und weisen eine deutlich höhere ROS-

Bildung als Hirnmitochondrien auf. Daraus haben Panov et al. [50] den Schluss gezogen, dass Rückenmarkmitochondrien ein höheres Risiko haben, durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress geschädigt zu werden.

### 1.5.1 Mitochondriale Unterschiede zwischen Neuronen und Nichtneuronen

Bis vor einiger Zeit galt, dass Astrozyten wenig oder gar kein Aralar enthalten sollten und deshalb nicht über den MAS verfügen können. Die Astrozytenmitochondrien sollten stattdessen über eine ausgeprägte  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitive Glutamat/Malat-Atmung verfügen [57]. Im Gegensatz dazu haben Li et al. [37] fast gleiche Aralar-Mengen in Astrozyten und Neuronen gefunden.

Bei vergleichenden Versuchen zwischen Mitochondrien, die aus Rattenhirn oder aus kultivierten Astrozyten isoliert wurden, fand Muth [46] in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ramos et al. [57] eine ausgeprägte  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitive Glutamat/Malat-Atmung bei Astrozytenmitochondrien sowie eine deutlich verminderte Pyruvatverwertung im Vergleich zu Hirnmitochondrien. Aus diesem Grund postulierte Muth, dass es funktionelle Unterschiede zwischen Mitochondrien aus Neuronen und Astrozyten gäbe. Da es aber schwierig ist, Mitochondrien aus Zellkulturen und Geweben zu vergleichen [63], untersuchte Muth ZNS-Regionen, die sich im Verhältnis zwischen Neuronen und Nichtneuronen unterscheiden sollen [26].

Im Gesamtgehirn vom Menschen wurde ein Nichtneuronen/Neuronen-Ratio von 0,99 gefunden [25]. Demzufolge sind 50% aller Hirnzellen Neuronen. Im Rattenhirn sind es 61% und im Hirn der Maus sogar 67%. Der höchste Neuronengehalt findet sich mit 91% im Cerebellum der Ratte und der geringste mit 12% in der Substantia Nigra der Ratte [25]. Demnach sollte es sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch zwischen den Regionen beträchtliche Funktionsunterschiede der Mitochondrien geben, die aus dem unterschiedlichen Neuronengehalt resultieren könnten [46].

### 1.5.2 Regionale Variationen in der Substrat-Verwertung

Neben der Zellheterogenität sind auch regionale Variationen im Substratstoffwechsel in Betracht zu ziehen. Glutamat kann aus  $\alpha$ -Ketoglutarat (über die Glutamat-Dehydrogenase) oder aus Glutamin (über die Glutaminase) sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten gebildet werden [43, 12]. Die Glutaminase wird dabei in Neuronen, Astrozyten und Nervenendigungen unterschiedlich reguliert [33, 12]. Im

Gegensatz dazu wird bei GABAergen Neuronen Glutamat zusätzlich zur GABA-Synthese verwendet.

## 1.6 Ziele und Fragestellung

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, gewebsspezifische Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierbarkeit von ZNS-Mitochondrien zu charakterisieren, deren mögliche Ursachen zu finden und ihre biologische Bedeutung zu klären. Dazu wurden Rattenhirnmitochondrien aus verschiedenen ZNS-Regionen untersucht, die sich sowohl in ihrer neurophysiologischen Funktion als auch in ihrem relativen Neuronengehalt voneinander unterscheiden.

Bei der Untersuchung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Mitochondrienfunktionen in diversen Krankheitsmodellen war aufgefallen, dass Mitochondrien aus verschiedenen ZNS-Regionen beträchtliche funktionelle Unterschiede aufwiesen [19]. So wurde in Mitochondrien aus dem Rückenmark und dem Hirnstamm eine ausgeprägte  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Glutamatverwertung durch OXPHOS gefunden, welche nur in geringem Maße durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben zu stimulieren war (auf  $< 200\%$ ), während bei Mitochondrien aus Cerebellum oder aus dem Gesamthirn die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Atmung gering war, jedoch durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben bis auf  $300\%$  zu steigern war.

Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung als Voraussetzung für den Gaspedal-Mechanismus angesehen wurde, hätte dies bedeuten können, dass Mitochondrien unterschiedlicher ZNS-Regionen in unterschiedlichem Maße durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierbar wären. Das hätte auch eine Ursache dafür sein können, warum bestimmte ZNS-Regionen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen besonders betroffen sind.

Weiterhin war aufgefallen, dass isolierte Hirnmitochondrien der Maus im Vergleich zu Rattenmitochondrien generell stärker durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierbar waren [16]. Diese zell- und gewebsspezifischen Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit der Glutamat/Malat-Atmung warfen die Frage auf, inwiefern diese auch Ausdruck von unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulierbarkeit des Energiestoffwechsels sind.

Wenn der Gaspedalmechanismus tatsächlich im postulierten Ausmaß über die durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierbare Bereitstellung von Pyruvat für die OXPHOS reguliert

wird, dann müsste dieser Mechanismus in allen Regionen in gleichem Maße funktionieren.

Darüber hinaus sollte auch geklärt werden, ob die (glutamatfreie) Pyruvatatmung in allen ZNS-Regionen bereits ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz nahezu vollständig aktiv ist und ob sie durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Gaben tatsächlich nur in sehr geringem Maße (von 85 auf 100%) aktiviert werden kann.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden vergleichende Untersuchungen an 9 verschiedenen ZNS-Regionen der Ratte durchgeführt. Anhand der Versuchsergebnisse wurden anschließend zwei ZNS Regionen (Cerebellum und Hirnstamm) mit den größten Unterschieden in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Glutamat/Malat-Atmung für weitere detaillierte Untersuchungen ausgewählt.

Im Mittelpunkt standen folgende Fragen:

1. Welche nachweisbaren funktionellen Unterschiede gibt es in Mitochondrien aus verschiedenen ZNS-Regionen?
2. Welche Ursache haben die nachgewiesenen regionalen Unterschiede der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierbarkeit der Glutamat/Malat-Atmung?
3. Lässt sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation der Pyruvatatmung durch Rutheniumrot hemmen, was als Indikator für die klassische Regulationshypothese gelten würde?
4. Gibt es gewebsspezifische Unterschiede in der Vulnerabilität der Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress?

Im zweiten Abschnitt der Studie wurden die zwei ausgewählten Modellregionen (Cerebellum und Hirnstamm) auch an Mäusen durchgeführt, um die obenerwähnten Unterschiede zwischen den zwei Spezies näher zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Versuche zum Vergleich verschiedener ZNS-Regionen wurden mit 8 Wochen alten männlichen Ratten vom Stamm WistarHan (genaue Stammbezeichnung: Crl:WI(Han)) durchgeführt. Die Zuchttiere wurden von der Firma Charles River regelmäßig bezogen. Die Haltungsräume des Leibniz-Instituts für Neurobiologie Magdeburg, in denen die Ratten gezüchtet und gehalten wurden, befanden sich in offener Haltung. Die klimatischen Parameter lagen entsprechend der Empfehlungen der GV-SOLAS bei  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  Raumtemperatur und  $55\% \pm 10\%$  relative Luftfeuchte. In den Räumen herrschte ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Zyklus.

Für den zweiten Teil der Experimente wurden 2 bis 4 Monate alte männliche Mäuse vom Stamm C57BL/6J verwendet. Dabei handelte es sich um den Original-J-Stamm aus dem Jackson Laboratory, der über Charles River bezogen wurde. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (*ad libitum*) und wurden in offener Haltung in Gruppen von 3-4 Tieren in Typ II Makrolonkäfigen unter Standardbedingungen gehalten. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus.

Das Sachkundenachweis für das Töten von Versuchstieren (§4 TierSchG) in Abstimmung mit dem Landesverwaltungsamt und Veterinäramt Magdeburg liegt vor.  
Leistungsnachweis: Januar 2016 (s. Anlagen 10.1)



## 2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.**

SA, Sigma Aldrich; CS, Chemsolute; Konz., Konzentration; Lag., Lagerung.

Chemikalien/ Fertigreagenzien	Firma	Katalog- Nr.	Konz. <sup>1</sup>	Lösungs- mittel	Lag.
Acetyl-CoA Lithiumsalz	SA	A2056	12,2 mM	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-20°C
ADP-Natriumsalz	SA	A2754	500 mM	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-20°C
Albumin	SA	A-7906	-	-	+4°C
Antimycin A	SA	A8674	1 mM	Ethanol <sub>100%</sub>	-20°C
L-Ascorbat	SA	A5960	500 mM	Tris-Puffer	jeden Tag neu
Natriumazid	SA	S2002	100 mM	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-20°C
Bicinchoninsäure	SA	B9643	-	-	+22°C
Kalziumchlorid	Merck	1.02382	100 mM	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	+4°C
Carboxyatractylosid	SA	C4992	1 mM	DMSO	-20°C
Kupfer-II-Sulfat	SA	C2284	-	-	+22°C
Digitonin	Serva	19550	-	-	+4°C
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SA	W387520	-	-	+22°C
Dithiothreitol	SA	D0632	-	-	+4°C
5,5'-Dithiobis- dinitrobenzoesäure (DTNB)	SA	D8130	1,01 mM	Tris-Puffer	+4°C
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	SA	E5134	-	-	+22°C
EGTA	SA	E4378	-	-	+22°C
Ethanol absolut	CS	2246	-	-	+22°C
L-Glutamat-Mononatriumsalz	SA	G5889	1 M	Tris-Puffer	-20°C
L- $\alpha$ -Glycerol-3-Phosphat-bis- Cyclohexalammoniumsalz	SA	G7886	1 M	Tris-Puffer	-20°C
HCl	Merck	1.09057	-	-	+22°C
L-Malat	SA	M1000	200 mM	Tris-Puffer	-20°C
D-Mannitol	Merck	1.05982	-	-	+22°C

<sup>1</sup> Konzentration der hergestellten Stammlösung

MOPS	SA	M9381	-	-	+22°C
Nagarse	SA	P8038	-	-	+4°C
PBS	SA	P4417	-	-	+22°C
Natriumpyruvat	SA	P5280	1 M	Tris-Puffer	jeden Tag neu
Oxalacetat	SA	O4126	10 mM	Triethanolaminhydrochlorid	-20°C
Rotenon	SA	R-8875	100 µM	Ethanol <sub>100%</sub>	-20°C
Rutheniumrot	SA	R-2751	5 µM	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-20°C
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	SA	M0250	-	-	+22°C
Saccharose	Merck	1.07651	-	-	+22°C
Natriumsuccinat-6-hydrat	SA	S5047	1 M	Tris-Puffer	-20°C
TMPD-Diammonium-Dichlorid	Merck	8.21102	100 mM	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	jeden Tag neu
Tris-Puffer	Merck	1.08382	0,1 M	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	+22°C
Triethanolaminhydrochlorid	SA	T9534	0,5 M	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	+22°C

## 2.3 Geräte und Gebrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien.**

Geräte/Gebrauchsmaterialien	Typ	Firma
Oxygraph	2k	Oroboros (Innsbruck, Österreich)
Präzisionwaage	Basic BA210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Vortexer	Vibrofix VF1 Electronic	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Mehrstellenmagnetprüher	RCT Basic	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
pH-Meter	Digital pH Meter 525	WTW (Rye Brook, USA)
EppendorfreaktionsgefäÙe	-	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Pipetten	-	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kunststoffpipettenspitzen	-	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Plattenreader	Sunrise	TECAN (Männedorf, Schweiz)
Mikrotiterplatte	-	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	RC 5B Plus	Sorvall (Waltham, Massachusetts, USA)

## 2.4 Herstellung von Medien und Pufferlösungen

### 2.4.1 Inkubationsmedien für Mitochondrien (BIM-0; BIM-1000)

Beide Medien enthielten 120 mM D-Mannitol, 60 mM KCL, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 40 mM MOPS und 0,1 mM EDTA. Der pH-Wert wurde durch Titration von 1 M HCl Lösung auf 7,4 eingestellt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Da BIM-0 kein EGTA enthält und somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht beeinflusst, war dies als ein nahezu neutrales Medium zur Kontrolle der mitochondrialen Funktion geeignet.

BIM-1000 enthielt zusätzlich 1000  $\mu\text{M}$  EGTA. Die Chelat-bildende Wirkung von EGTA minimiert die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reproduzierbar auf 10 nM und erlaubt eine bessere und kontrollierte Beobachtung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einflusses auf die mitochondriale Funktion.

Um die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu bestimmen, wurden fluorimetrische Untersuchungen mit Fura-2 an intakten Mitochondrien durchgeführt (Z. Gizatullina; unveröffentlichte Ergebnisse). Bei schrittweiser Zugabe von je 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  erhöht sich die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 10 nM auf 114, 302, 416, 648, 850, 1330, 1385, 1513 und 1514 nM. Bei RR-gehemmten Mitochondrien steigt die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 10 nM auf 114, 302, 676, 1198, 1988, 3062, 4900, 10283 nM, da diese Mitochondrien kein  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen können.

#### 2.4.2 Präparationsmedien für Mitochondrien (MSE-A; MSE-B)

Die Präparationsmedien enthielten 225 mM Mannitol, 75 mM Saccharose, 20 mM MOPS und 0,5 mM DTT, wobei MSE-A 1 mM EGTA und MSE-B 0,1 mM EGTA enthielt. Der pH-Wert wurde durch Titration von 1 M HCl Lösung auf 7,4 eingestellt und anschließend wurden die Medien bei -20°C gelagert.

### 2.5 Präparation der ZNS-Regionen

Die Präparation der ZNS-Regionen wurde unter Anleitung von Dr. Sven Nullmeier (Institut für Anatomie, Universität Magdeburg) durchgeführt.

Die Anästhesie und Tötung der Ratten erfolgten im Leibniz-Institut<sup>2</sup> und der Mäuse im Institut für Physiologie<sup>3</sup>.

#### 2.5.1 Betäubung und Dekapitation der Versuchstiere

Die Anästhesie wurde mit Isofluran in einer Narkosebox eingeleitet. Anschließend wurden die Tiere mittels einer dafür geeigneten Schere dekapitiert.

#### 2.5.2 Rückenmark

Die Haut wurde mit einer Schere entlang der Wirbelsäule bis vor die Schwanzwurzel aufgeschnitten. Anschließend wurde die Rückenmuskulatur entfernt bis man die Wirbelkörper erkennen konnte. Mittels einer Schere wurden die Wirbelbögen beidseitig durchgeschnitten. Mit einem gebogenen Spatel wurden die Spinalnerven durchtrennt und das Rückenmark konnte herausgelöst werden.

#### 2.5.3 Gesamthirn

Mit einer Schere wurde die Kopfhaut eingeschnitten und diese entlang der Mittellinie von caudal nach rostral mittig durchtrennt, um freien Zugang zum Schädelknochen zu bekommen. Hals- und Nackenmuskulatur wurden mit einer Schere entfernt, um

---

<sup>2</sup> Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg

<sup>3</sup> Institut für Physiologie der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

das Foramen magnum darzustellen. Im Bereich des Foramen magnum wurden mit einer Knochenzange Teile der Schädelkapsel entfernt. Die Dura mater wurde mit Hilfe einer Schere eröffnet und mit einer feinen Pinzette behutsam entfernt. Die Bulbi olfactorii und Anteile des frontalen Endhirns wurden vorsichtig abgetrennt und der verbliebene Hirnanteil mit einem gebogenen Spatel aus der Schädelgrube herausgelöst [45].

Diese Schritte waren für die Präparation der unten erwähnten Regionen notwendig und gelten ab diesem Punkt als durchgeführt.

#### 2.5.4 Cerebellum

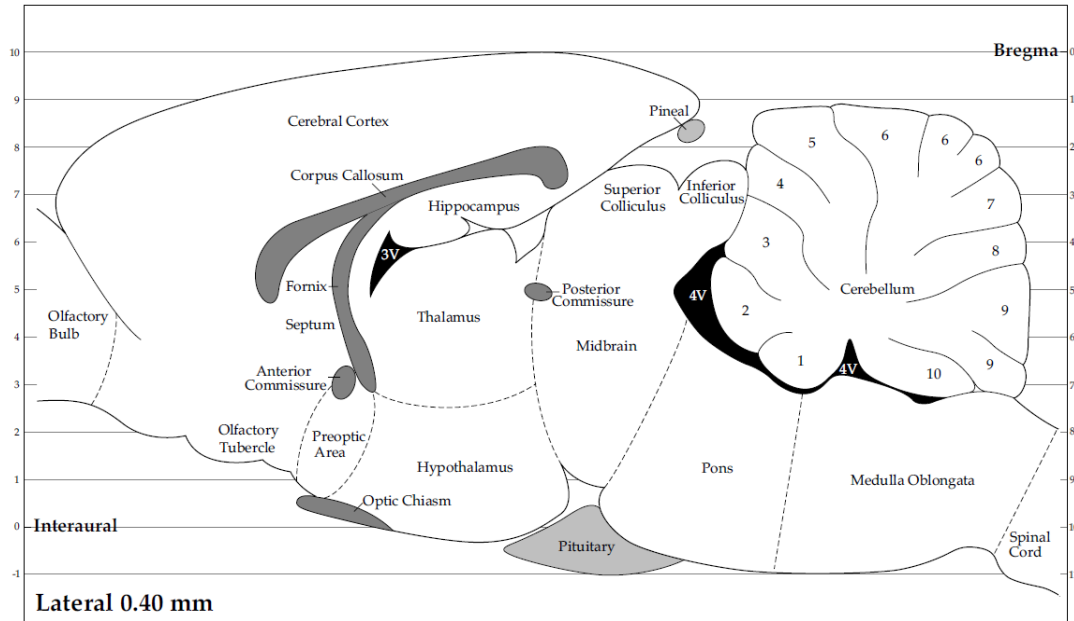
Das Cerebellum wurde vorsichtig mit zwei gebogenen Pinzetten vom restlichen Gehirn gelöst, bis die Pedunculi cerebelli gut zu sehen waren. Mit einem Skalpell wurden die Pedunculi durchtrennt und das Cerebellum konnte entnommen werden.

#### 2.5.5 Hirnstamm

Zuerst wurde das Cerebellum mit der oben genannten Methode entfernt. Die Cortexanteile wurden mit einer gebogenen Pinzette nach rostral gedrängt, um freie Sicht auf die Colliculi superiores zu erschaffen. Die Begrenzung der Colliculi war gut erkennbar, sodass man an der Stelle mit einem Skalpell den Hirnstamm<sup>4</sup> vom restlichen Gehirn durchtrennen konnte.

---

<sup>4</sup> Komponente des Hirnstamms: Mittelhirn, Pons und Medulla Oblongata (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Mediane Sagittalansicht des Rattenhirns.**

[54]

### 2.5.6 Cortex

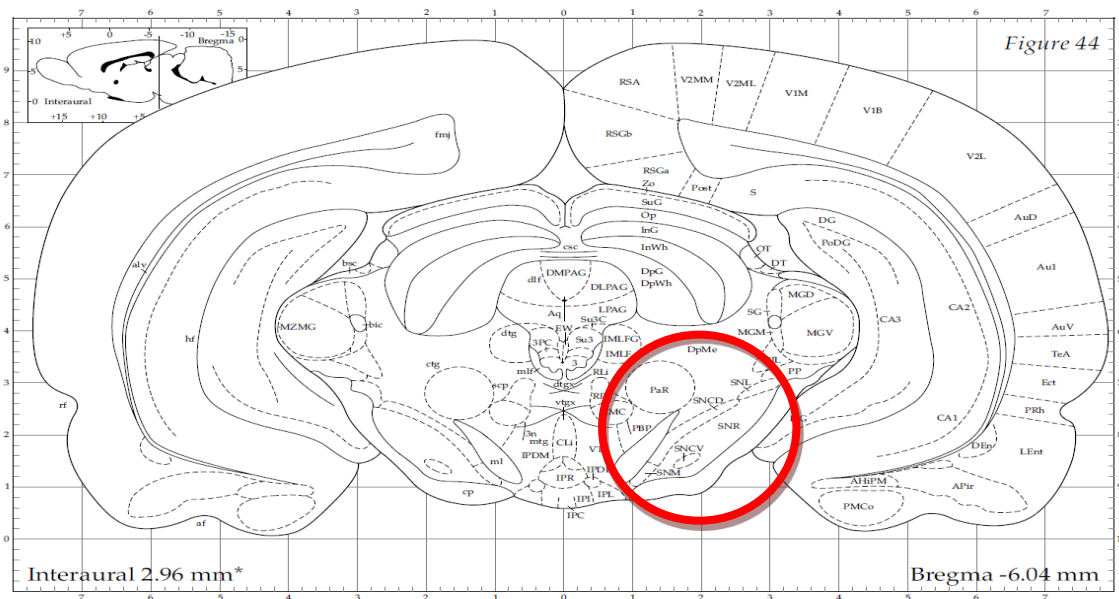
Das Cerebellum und der Hirnstamm wurden wie oben beschrieben entfernt. Anschließend wurden die beiden Hemisphären mit einem Skalpell median-sagittal voneinander getrennt. Die zu präparierende Hemisphäre wurde mit der medialen Seite zum Betrachter gelegt. Mit Hilfe einer gebogenen Pinzette wurden die Nicht-Cortexanteile wie der Thalamus und Hypothalamus vom Cortex abgelöst.

### 2.5.7 Corpus callosum

Nach der Präparation des Gesamthirns wurden die Cortexanteile der zwei Hemisphären mit den Unterseiten zweier gebogener Pinzetten auseinander gedrängt, um eine atraumatische Präparation zu erschaffen, sodass eine freie Sicht auf das ganze Corpus callosum bestand. Dieses wurde dann vorsichtig mit den zwei Pinzetten vom restlichen Gehirn bis zu den lateralen Ventrikeln präpariert, bis man es komplett entfernen konnte.

### 2.5.8 Substantia nigra

Die kaudalen Cortexanteile wurden mittels einer gebogenen Pinzette nach rostral gedrängt, um freie Sicht auf die Colliculi superiores zu erschaffen. Mit einem Skalpell wurde zuerst in der Mitte der Colliculli (Bregma -6.04 mm, siehe Abbildung 7) und dann direkt rostral davon (Bregma -4.80 mm, siehe Abbildung 8) senkrecht geschnitten. Unter dem Mikroskop konnte man auf der rostralen Seite des Präparats die typische Struktur der Substantia nigra erkennen, die anschließend beidseits mit dem Skalpell herausgeschnitten wurde.



**Abbildung 7: Coronaransicht des Rattenhirns in der Mitte der Colliculi superiores. [54]**

SNR: Substantia nigra Pars reticularis, SNCV: Substantia nigra ventraler Teil der Pars compacta, SNCD: Substantia nigra dorsaler Teil der Pars compacta, SNL: Substantia nigra lateraler Teil, SNM: Substantia nigra medialer Teil.





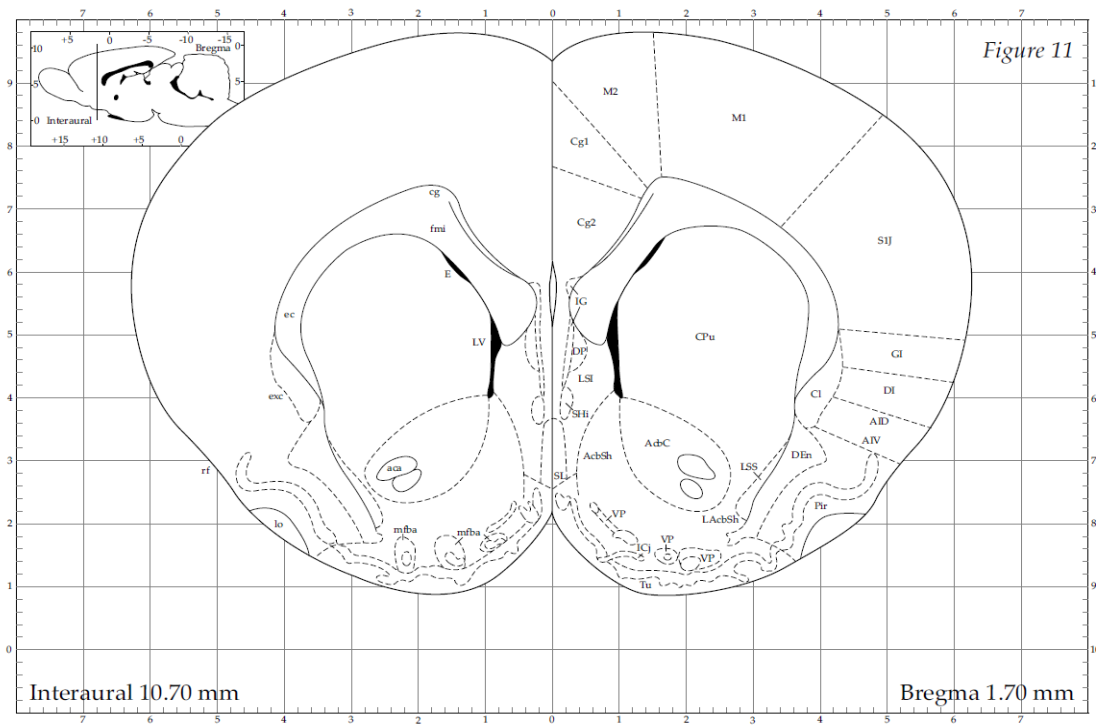


Abbildung 9: Coronaransicht des Rattenhirns kurz vor dem Beginn des Corpus Callosum. [54]

CPu: Caudate Putamen (Striatum)

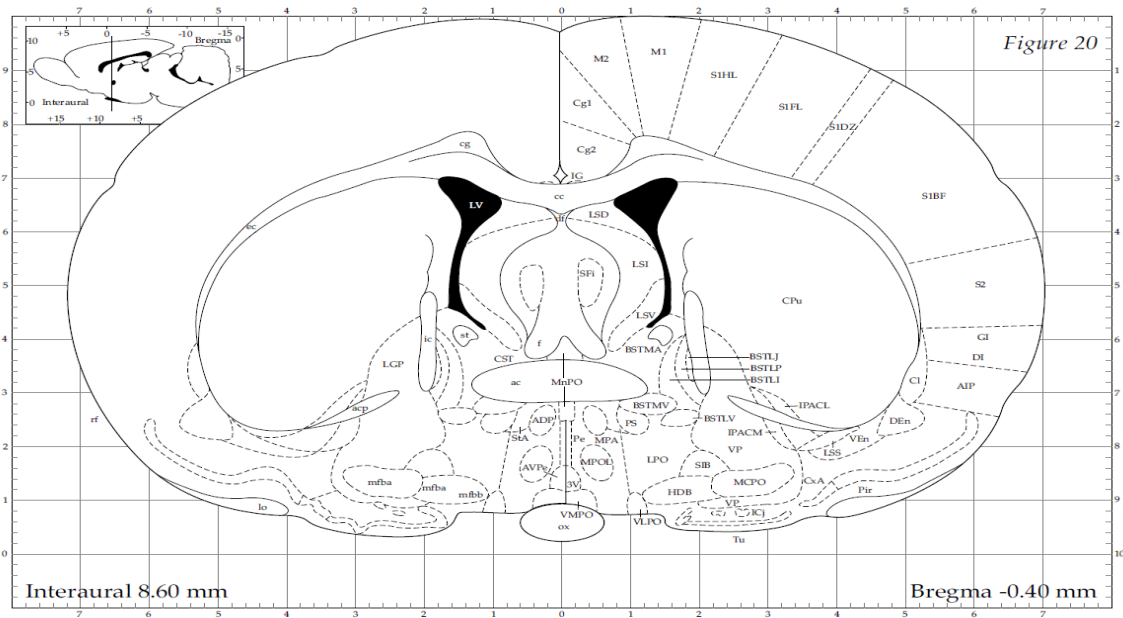


Abbildung 10: Coronaransicht des Rattenhirns zwischen dem ersten und zweiten Drittel des Corpus Callosum. [54]

CPu: Caudate Putamen (Striatum)

Unmittelbar nach der Präparation wurden die Präparate in Behälter mit kalter EGTA-reicher MSE-A-Lösung gelegt, um die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu minimieren und in einem Kühlbehälter vom Leibniz-Institut<sup>5</sup> zu unserem Labor im Haus 60a transportiert (innerhalb von ca. 5 Minuten), wo sie direkt weiter verarbeitet wurden.

## 2.6 Isolation der Mitochondrien

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte mit der Methode von Kudin et al. [31] Die Präparate wurden zuerst mit einer Schere zerkleinert und anschließend in 2 ml MSE-A-0,05%-Nagarse-Lösung (1 ml/g Gewebe) mithilfe eines Glas-Homogenisators per Hand homogenisiert. Die Homogenate wurden danach mit 5 ml kalter MSE-A-Lösung versetzt und bei 4.000 UpM in einem Sorvall SS-34 Rotor einer Sorvall RC 5B Plus Zentrifuge für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Filtertuch dekantiert und bei 10.000 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zur Permeabilisierung der Synaptosomen mit 5 ml MSE-A-0,02%-Digitonin resuspendiert und dann 10 Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Das finale Pellet wurde mit 80  $\mu\text{l}$  MSE-B resuspendiert und mit Hilfe von 100  $\mu\text{l}$  Eppendorfpipetten homogenisiert. Unmittelbar danach wurde der Proteingehalt bestimmt. Die erhaltenen Stammsuspensionen wurden bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Mitochondrienfunktion blieb bis zu 5 Stunden in ausreichender Qualität erhalten.

## 2.7 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem *Bicinchoninic Acid Kit for Protein determination* der Firma Sigma nach der Methode von Wiechelman et al. [70] durchgeführt.

## 2.8 Citratsynthase-Aktivität

Zur Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität wurden nach der Homogenisierung der Präparate, die schon mit MSE-A-Lösung angereichert waren, 20  $\mu\text{l}$  entnommen und

---

<sup>5</sup> Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg

in Reaktionsgefäßen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, da die Messung zu einem späteren Zeitpunkt stattfand. Für die Messung wurde ein Inkubationsmedium mit 0,125 mM DTNB, 0,465 mM Acetyl-CoA und 0,625 mM Oxalacetat (gelöst in Wasser) verwendet, in welches anschließend 2,5  $\mu\text{l}$  von dem Homogenat zugegeben wurden. Die Suspension wurde danach mit dem Ultrasonic processor GEX 600-5 (Firma Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT) zweimal für 15 Sekunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 12% Amplitude beschallt. Die Citratsynthase katalysiert die Reaktion  $\text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Citrat} + \text{CoA-SH}$ . Das CoA-SH reagiert anschließend mit DTNB, wobei es sich TNB und CoA-S-S-TNB bildet. Mit dem Gerät Modernised Aminco DW 2 der Firma On-Line Instruments System (OLIS), Inc (Bogart, GA, USA) kann dann bei  $30^{\circ}\text{C}$  und bei einer Wellenlänge von 412/600 nm ( $\epsilon=13,6 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ ) die Extinktion von CoA-S-S-TNB gemessen werden. Die Formel zur Berechnung der Enzymaktivität lautet  $A = \left(\frac{TV}{HV}\right) * \left(\frac{\Delta E}{\epsilon}\right) * \frac{1000}{\text{mg Gewebe}} \text{ U/g Gewebe}$ , wobei TV = Totalvolumen, HV = Volumen des Homogenats,  $\Delta E$  = Extinktion und  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient.

## 2.9 Respirometrie

Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien wurde am Oxygraph-2k (Clark-Typ-Elektrode; Firma Oroboros, Innsbruck, Austria) in 2,2 ml BIM-1000 bzw. BIM-0 Medium unter elektromagnetischem Rühren bei  $30^{\circ}\text{C}$  gemessen. Nach Zugabe des Mediums (BIM-0 bzw. BIM-1000) und der Substrate in die Messkammern steigt die Sauerstoffkonzentration kurzzeitig an. Danach normalisiert sich der Sauerstoffgehalt in den Kammern wieder auf den Umgebungsdruck, sodass die Messung anfangen kann. Jeweils 0,06 mg/ml Mitochondrien wurden in die Messkammer gegeben. Bei zu hoher oder zu geringer (z.B. für Rückenmarkmitochondrien) spezifischer Aktivität wurden 0,04 bzw. 0,1 mg/ml Mitochondrien eingesetzt. Anschließend wurden die Kammern mit einem Stopfen luftdicht verschlossen. Durch eine Kapillare, im Inneren der Stopfen, wurden die Substrate mittels Hamiltonspritzen in die Kammern verabreicht. Darauf folgend wurde die mitochondriale Atmung in Gegenwart verschiedener Substrate aufgezeichnet.

## 2.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse wurde in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto von Guericke Universität Magdeburg durchgeführt. Dafür wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24 (Armonk, NY) verwendet.

In einem ersten Schritt wurden insgesamt bzw. für verschiedene Untergruppen deskriptive Analysen durchgeführt, die im Ergebnis Lage und Streuungsparameter lieferten.

Je nach Fragestellung kamen bei der Auswertung der quantitativen Daten verschiedene varianzanalytische Methoden zum Einsatz, insbesondere univariate Varianzanalysen mit Messwiederholung, aber auch einfaktorielle Varianzanalysen mit anschließenden Post-Hoc-Tests. Zum Vergleich quantitativer Daten bzgl. zweier Untergruppen wurden Mittelwertvergleiche in Form von t-Tests für unabhängige Stichproben verwendet. Bei allen Tests wurde als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  angenommen.

Die grafische Darstellung aller Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaPlot (Systat, Erkrath, Deutschland) in Form von Säulendiagrammen und Kurven, in denen die Mittelwerte der Atmungsraten mit dem Standardfehler abgebildet sind ( $MW \pm SE$ ).

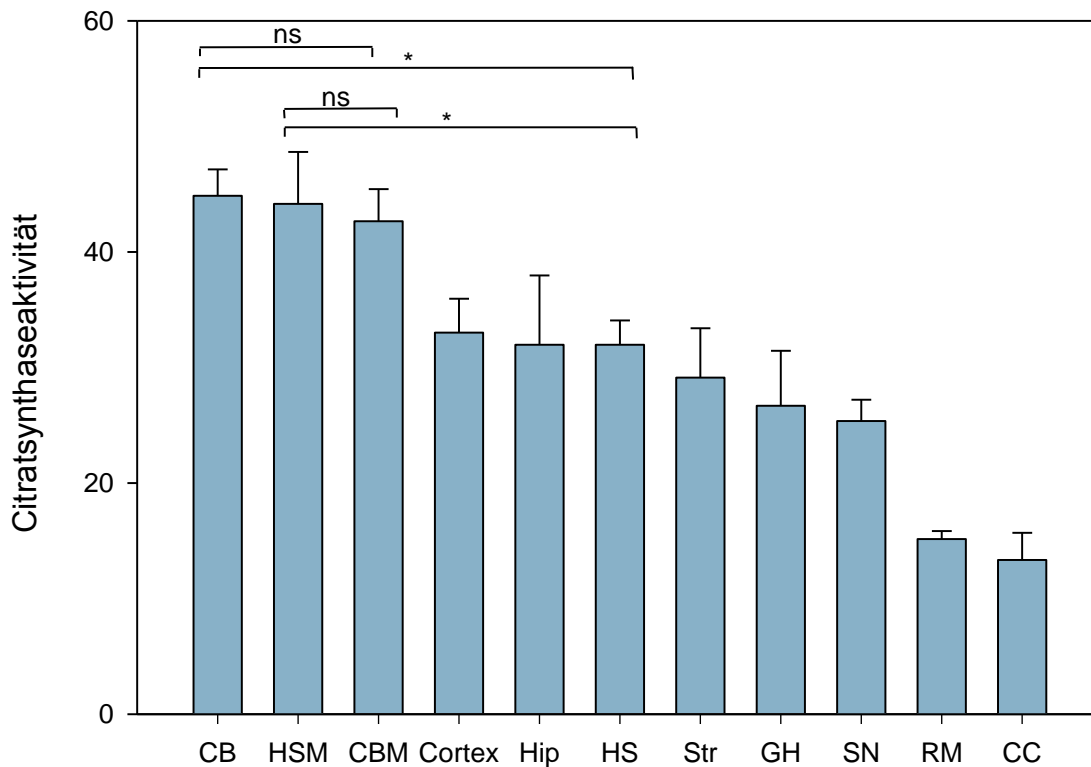
### 3 Ergebnisse

Zur Charakterisierung regionaler Besonderheiten der Mitochondrienfunktion wurden Mitochondrien aus neun ZNS-Regionen der Ratte (Gesamthirn, Rückenmark, Hirnstamm, Cerebellum, Hippocampus, Cortex, Striatum, Corpus callosum und Substantia Nigra) isoliert. Bei jedem Experiment wurden zwei verschiedene Regionen miteinander verglichen. Sowohl aus Vorversuchen [46] als auch aus den oben genannten Messungen ergab sich, dass sich die Mitochondrien vom Cerebellum und dem Hirnstamm bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation in besonderem Maße voneinander unterschieden, sodass diese als Modellregionen ausgewählt wurden. Um auch speziebedingten Unterschieden Rechnung zu tragen, wurden diese Modellregionen zusätzlich an Mäusen untersucht.

#### 3.1 Citratsynthase-Aktivität

Als Marker für den Mitochondriengehalt jeder Region wurde die Aktivität der Citratsynthase gemessen, da dieses Enzym ausschließlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist [65]. Wie in Abbildung 11 ersichtlich, wurde der höchste Mitochondriengehalt im Cerebellum der Ratte gefunden, der signifikant deutlich höher war als im Hirnstamm. Im Gegensatz dazu waren die Mitochondriengehalte in beiden Geweben der Maus nicht unterschiedlich und ähnlich hoch wie im Cerebellum der Ratte. Die Mitochondriengehalte des Rückenmarks und des Corpus Callosums waren im Vergleich zum Cerebellum um etwa 66% geringer, was dem geringeren Gehalt an Somata bzw. dem vermehrten Gehalt an Axonen in diesen Regionen entspricht.

Die unterschiedlichen Mitochondriengehalte der ZNS-Regionen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit, da alle Atmungsgeschwindigkeiten als spezifische, auf mg Mitochondrienprotein bezogene Umsatzraten angegeben wurden.

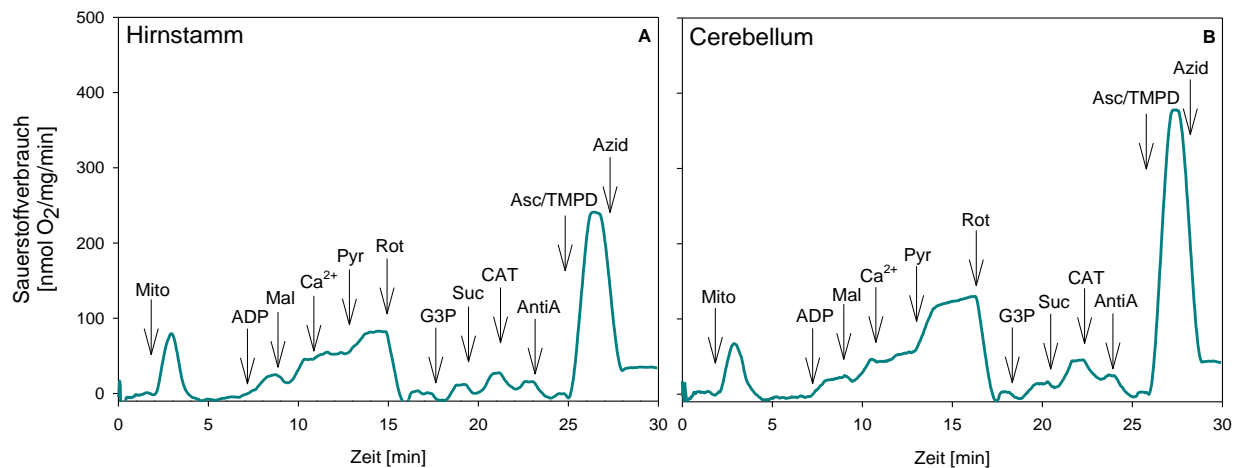


**Abbildung 11: Die Citratsynthase-Aktivität als Maß für den Mitochondriengehalt in den untersuchten ZNS-Regionen von Ratte und Maus.**

Aktivität der Citratsynthase in den untersuchten ZNS-Regionen als Mittelwert in U/g Gewebe  $\pm$  S.E. von  $\geq 5$  Präparationen (Ausnahme Cortex: 2 Präparationen), geordnet nach der Größe. CB, Cerebellum; HSM, Hirnstamm von Mäusen; CBM, Cerebellum von Mäusen; Hip, Hippocampus; HS, Hirnstamm; Str, Striatum; GH, Gesamthirn; SN, S. Nigra; RM, Rückenmark; CC, Corpus Callosum. \*, signifikante Unterschiede mit  $p \leq 0,05$ ; ns, nicht signifikanter Unterschied.

### 3.2 Regionale Unterschiede in der Mitochondrienfunktion

Zum Nachweis substratspezifischer Unterschiede in der Mitochondrienfunktion verschiedener ZNS-Regionen dienten oxygraphische Messungen in EGTA-enhaltenden Medien, welche die Einstellung von variablen und reproduzierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen erlauben (s. Kapitel 2.4.1). Abbildung 12 zeigt typische Respirogramme von Mitochondrien des Hirnstamms und des Cerebellums der Ratte.



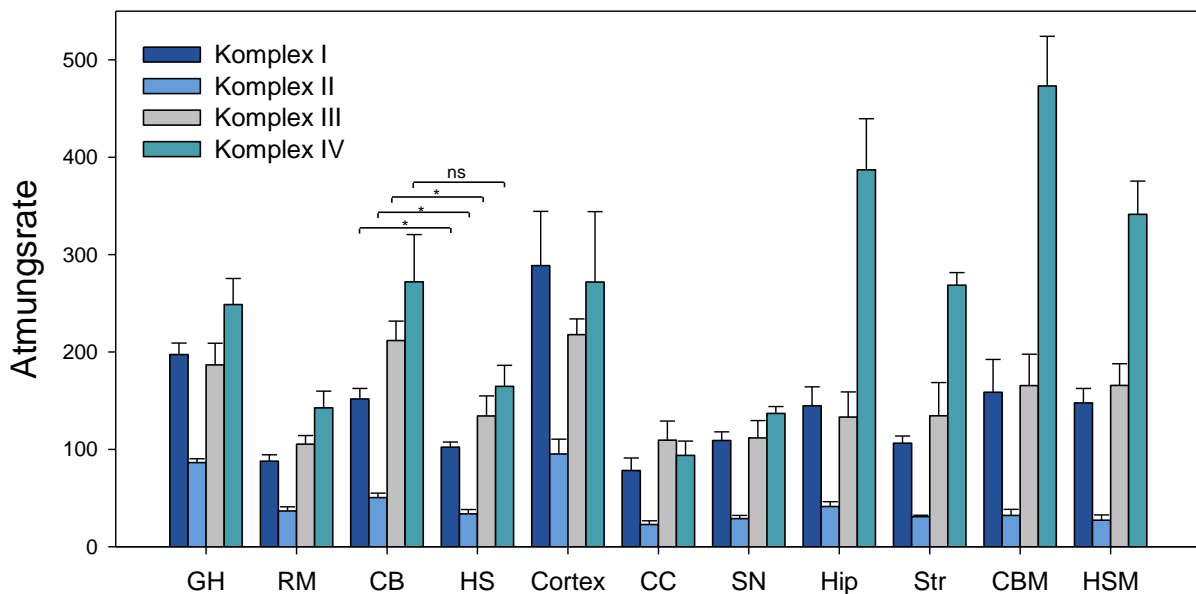
**Abbildung 12: Respirometrische Charakterisierung funktioneller Eigenschaften von Mitochondrien aus Cerebellum und Hirnstamm von gesunden Ratten durch den EGTA-Ansatz.**

Inkubation von Rattenmitochondrien isoliert aus dem Hirnstamm und dem Cerebellum in EGTA-Medium mit 10 mM Glutamat als Substrat. Zugaben: Mito, 0,06 mg/ml; ADP, 2 mM ADP; Mal, 2 mM Malat; Ca<sup>2+</sup>, 450  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>; Pyr; 10 mM Pyruvat; Rot, 1,25 nM Rotenon; G3P, 10 mM Glycerol-3-Phosphat; Suc, 10 mM Succinat; CAT, 2,5  $\mu$ M Carboxyatractylosid; AntiA, 1  $\mu$ M Antimycin A; Asc/TMPD, 4 mM Ascorbat + 1 mM TMPD, Azid, 5 mM Azid. Dargestellt werden typische oxygraphische Messkurven, ausgewählt aus 10 Einzelmessungen. Pyruvatindex (Berechnung s. Text S. 31): Hirnstamm 1,8; Cerebellum 2,8. Der Einfachheit halber wurden die Sauerstoffkonzentrationskurven weggelassen.

Zu Beginn der Messungen enthielt das Medium nur überschüssiges ADP und Glutamat ohne Ca<sup>2+</sup>-Zusatz. Durch den hohen EGTA-Gehalt (1 mM) wurde die extramitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gering gehalten (ca. 10 nM Ca<sup>2+</sup>), so dass ausschließlich die durch den Ca<sup>2+</sup>-insensitiven Glutamat-Carrier bedingte Atmung bestimmt werden konnte. Nach Zugabe von Malat schloss sich der Anteil der Aralarbedingten Atmung an, der ohne Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung arbeitet. Nach Zusatz von 450 nM Ca<sup>2+</sup> wurde Aralar partiell aktiviert, was eine weitere Steigerung der Atmungsgeschwindigkeit bewirkte. Darauf folgend wurde Pyruvat, das wichtigste Substrat zur Energiegewinnung der Hirnmitochondrien, zugegeben. Da die Substratkombinationen Glutamat/Malat und Pyruvat/Malat jeweils mit großer Aktivität über den Komplex I der Atmungskette oxidiert werden, wurde die Atmungsgeschwindigkeit unter diesen Bedingungen nur durch die Kapazität des Komplex I begrenzt. Durch Hemmung dieses Komplexes mit Rotenon, wurde die Atmung vollständig gehemmt und demzufolge konnte anschließend mit G3P die G3PDH-abhängige und mit Succinat die Komplex-II-abhängige Atmung erfasst werden. Nach Hemmung des AdN-Translokators mit Carboxyatractylosid (CAT) und

des Komplexes III mit Antimycin A ließ sich schließlich mit Ascorbat/TMPD die Aktivität der Cytochromoxidase (Komplex IV) erfassen, die durch Azid spezifisch gehemmt wurde.

Dieser Ansatz erlaubt somit die vergleichende Messung der Kapazitäten von den Komplexen I, II, und IV sowie die substratspezifischen Atmungsraten, die für die Malat-Aspartat-Shuttle und G3P-Shuttle von Bedeutung sind. Die noch fehlende Kapazität von Komplex III und der respiratorische Kontrollindex (RCI) wurden mit dem Kontrollansatz (Abbildung 25) gemessen. Abbildung 13 stellt die komplexspezifischen Atmungsraten der Mitochondrien aus den 9 verschiedenen ZNS-Regionen der Ratte sowie aus zwei Regionen der Maus dar.



**Abbildung 13: Komplex-abhängige Atmungsraten von isolierten Mitochondrien aus in den untersuchten verschiedenen ZNS-Regionen von Ratte und Maus.**

Atmungsraten aus Messungen mit dem EGTA-Ansatz wie in Abbildung 12 und mit dem Kontrollansatz wie in Abbildung 25 gezeigt als Mittelwert in  $\text{nmol O}_2/\text{mg}/\text{min} \pm \text{SE}$  von  $\geq 5$  Messungen (Ausnahme Cortex: 2 Messungen). GH, Gesamthirn; RM, Rückenmark; CB, Cerebellum; HS, Hirnstamm; CC, Corpus Callosum; SN, S. Nigra; Hip, Hippocampus; Str, Striatum; CBM, Cerebellum von Mäusen; HSM, Hirnstamm von Mäusen. \*, signifikante Unterschiede mit  $p \leq 0,05$ ; ns, nicht signifikanter Unterschied. Die Unterschiede zwischen Cerebellum und Hirnstamm von Mäusen waren nicht signifikant.

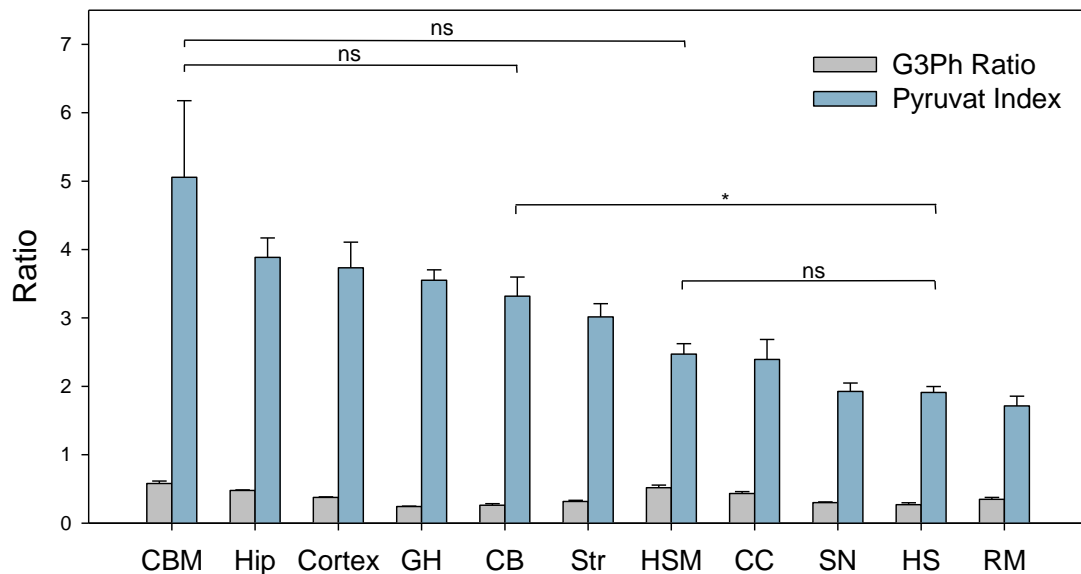
Die jeweils höchsten Aktivitäten fanden sich für die Cytochromoxidase (Ausnahme Corpus Callosum), während die Komplex-II-Aktivität jeweils am geringsten war. Die Aktivitäten von Komplex I und III waren ähnlich, jedoch war die Komplex-III-Atmung



in der Regel höher als die Komplex-I-Atmung, mit den Ausnahmen Gesamthirn, Cortex und Hippocampus, wo die Komplex-I-Atmung höher war. Dennoch, obwohl die Komplexaktivitäten zwischen den verschiedenen ZNS-Regionen insgesamt schwankten, herrschte in der Regel das oben beschriebene Verhältnis: Komplex IV > Komplex III > Komplex I > Komplex II.

Beim Vergleich der Daten von Rattenmitochondrien fällt auf, dass die maximalen Atmungsraten der Komplexe I, II, III im Cerebellum signifikant und des Komplexes IV tendenziell höher sind als im Hirnstamm. Bei den Mausmitochondrien ist nur die Komplex IV-Atmung im Cerebellum deutlich größer als im Hirnstamm, während die Atmungsraten der anderen Komplexe in beiden Regionen ähnlich sind.

Abbildung 14 zeigt die Ratios zur Quantifizierung der relativen Pyruvat- und G3P-Atmungsraten, den Pyruvat-Index ( $Pyruvat\ Index = \frac{State-3-Atmung_{Pyr+Ca}}{State-3-Atmung_{G/M+Ca}}$ ) und die G3Ph-Ratio ( $G3Ph - Ratio = \frac{State-3-Atmung_{G3P}}{State-3-Atmung_{suc}}$ ), die aus den in Abbildung 12 dargestellten Messungen berechnet wurden. Der Pyruvat-Index enthält demnach auch die  $Ca^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat- und der Pyruvatatmung. Aus Vorarbeiten [46] deutete sich an, dass hohe Pyruvat-Indices besonders in neuronalen Mitochondrien vorkommen, während hohe G3P-Ratios Kennzeichen für Mitochondrien von Astrozyten sein könnten. Obschon beim vorliegenden Gewebsvergleich große Unterschiede im Pyruvat-Index festgestellt wurden (Pyruvat-Index: 1,7 - 5,1), waren diese für die G3Ph-Ratio geringer (G3Ph-Ratio: 0,24 - 0,58). Weiterhin korrelierten die Änderungen beider Parameter nicht miteinander. Bei der Ratte war der Pyruvat-Index im Cerebellum signifikant höher als im Hirnstamm.



**Abbildung 14: Regionaler Vergleich der G3Ph-Ratios und des Pyruvat-Index.**

G3Ph-Ratios und Pyruvat-Indices berechnet aus in Abbildung 12 dargestellten Messkurven (EGTA-Ansatz) als Mittelwerte  $\pm$  S.-E von  $\geq 5$  Messungen (Ausnahme Cortex: 2 Messungen), geordnet abfallend nach der Größe. CBM, Cerebellum von Mäusen; Hip, Hippocampus; GH, Gesamthirn; CB, Cerebellum; Str, Striatum; HSM, Hirnstamm von Mäusen; CC, Corpus Callosum; SN, S. Nigra; HS, Hirnstamm; RM, Rückenmark. \*, signifikante Unterschiede (für Pyruvat-Index) mit  $p \leq 0,05$ ; ns, nicht signifikanter Unterschied; zwischen den G3Ph-Ratios zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.3 Regionale Unterschiede in der $Ca^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat- und Pyruvat-abhängigen Atmung

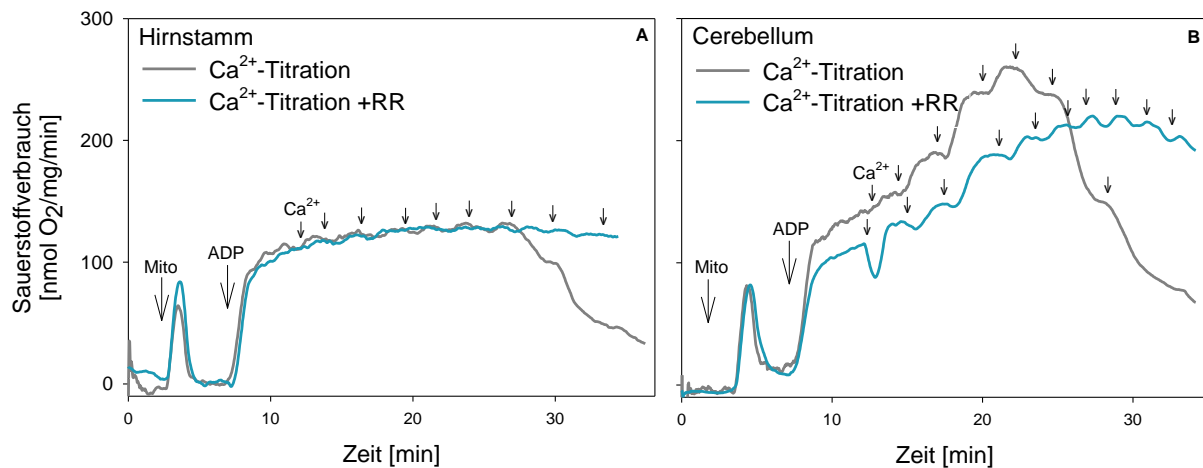
Betrachtet man die Reaktionswege des Malat-Aspartat-Shuttles (MAS) (Abbildung 2), so kann man feststellen, dass diese die Verstoffwechslung der Substratpaare Glutamat/Malat und Pyruvat/Malat beinhalten. Mit der Untersuchung dieser beiden Substratpaare können somit alle mitochondrialen Teilreaktionen des MAS erfasst werden, da Aspartat und  $\alpha$ -Ketoglutarat sowohl im kompletten MAS als auch bei der alleinigen Verwertung von Glutamat/Malat gebildet werden. Demnach stellt das Substratpaar Glutamat/Malat das einfachste Modell für den MAS dar (Tabelle 1, Mode 1). Mit dem Substratpaar Pyruvat/Malat kann der Teil des MAS erfasst werden, der gewöhnlich nicht dazu gezählt wird, welcher aber über das RedOx-Paar  $NAD^+/NADH$  fest mit dem MAS verbunden ist (Mitochondriales Gaspedal). Durch Zusatz der weiteren Substrate des MAS (Laktat,  $NADH$ , Malat, Aspartat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Glutamat) wird die Komplexität des MAS-Modells erhöht (Mode 2). Schließlich kann durch Zugabe der zytosolischen Enzyme des MAS der vollständige

Shuttle rekonstruiert werden (Mode 3), womit auch außerhalb intakter Zellen alle wesentlichen Aspekte des vollständigen MAS an isolierten Mitochondrien untersucht werden können.

**Tabelle 3: Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen MAS-Modelle mit steigender Komplexität (s. auch Abbildung 23 und Abbildung 24).**

Stufenweise Rekonstitution des MAS	Substrate	Metabolische Effekte und Hemmstoffe
Mode 1 (minimaler MAS)	Glutamat/Malat, ADP	Glutamat/Malat-getriebene Atmung (state 3); reguliert durch <u>extramitochondriales</u> $\text{Ca}^{2+}$ über die Aktivierung von Aralar.
Mode 2 (unvollständiger MAS)	Glutamat/Malat, ADP, Laktat-Dehydrogenase (LDH)  + $\alpha$ -Ketoglutarat, Aspartat, Laktat, NADH	Anwesenheit der MAS-Substrate und LDH, aber Abwesenheit der MAS-Enzyme GOT und MDH; Diese MAS-Stufe ist $\text{Ca}^{2+}$ -sensibel ( <u>extramitochondrial</u> ), kann aber kein Pyruvat bilden und ist somit unvollständig.
Mode 3 (vollständiger MAS)	Glutamat/Malat, ADP, $\alpha$ -Ketoglutarat, Aspartate, Laktat, NADH  + Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Malat-Dehydrogenase (MDH)	Zugabe der MAS-Substrate und –Enzyme, was eine kontinuierliche Pyruvatbildung mit maximaler Geschwindigkeit erlaubt und über <u>extramitochondriales</u> $\text{Ca}^{2+}$ reguliert wird.  Cinnamat (Cin) hemmt die mitochondriale Aufnahme von Pyruvat; Aminoxyacetat (AOA) hemmt das MAS-Enzym GOT.

Bereits bei den in Abbildung 12 dargestellten Experimenten wurde erkennbar, dass das Ausmaß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung zwischen den verschiedenen ZNS-Regionen variiert. Aus Kapazitätsgründen wurden die zusätzlichen Versuche zur Charakterisierung dieser regionalen Unterschiede auf die bereits erwähnten Modellregionen (Cerebellum und Hirnstamm) begrenzt. Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurden Mitochondrien in EGTA-Medium mit den Substraten Glutamat/Malat inkubiert und in parallelen Ansätzen mit und ohne Rutheniumrot (RR), dem Hemmstoff des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters, einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration unterzogen.



**Abbildung 15: Regionalspezifische Unterschiede bei der Ca<sup>2+</sup>-Titration der Glutamat/Malat-Atmung.**

Inkubation von Rattenmitochondrien isoliert aus Hirnstamm und Cerebellum in EGTA-Medium mit 10 mM Glutamat und 2 mM Malat, sowie mit und ohne 200 nM RR (Rutheniumrot). Zugaben: Mito, 0,06 mg/ml; ADP, 2 mM ADP; Ca<sup>2+</sup>, die ersten drei Zugaben in 200 µM-Schritten und anschließend in 100 µM-Schritten. Dargestellt werden typische oxygraphische Messkurven, ausgewählt aus 6 Einzelmessungen.

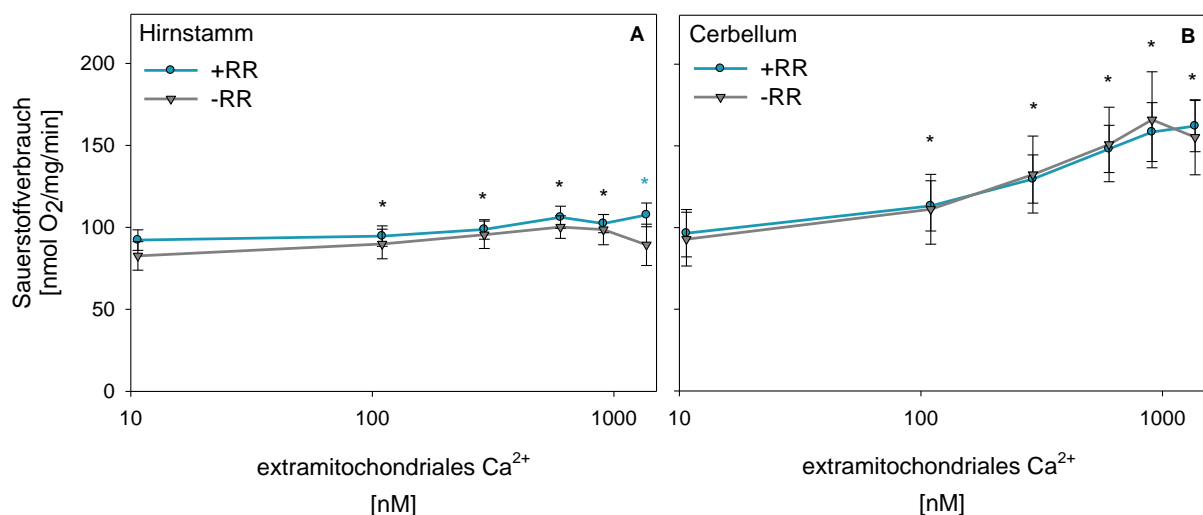
Die mit ADP eingestellte State-3-Atmung ließ sich im Hirnstamm (Abbildung 15A) durch Ca<sup>2+</sup>-Gaben nur leicht stimulieren. Überstieg die extramitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration 1,5 µM, so wurde die Atmungsgeschwindigkeit ohne RR zunehmend gehemmt. Ursache war hierbei die schädigende Wirkung der Ca<sup>2+</sup>-Überladung (s. Einleitung), die durch RR erwartungsgemäß verhindert wurde.

Ein anderes Bild ergab sich bei Mitochondrien aus dem Cerebellum (Abbildung 15B). Hier bewirkten die Ca<sup>2+</sup>-Gaben einen deutlichen Anstieg der Atmungsraten auf über 200% der Ausgangsatmung. Dass diese Aktivierung auch in Gegenwart von RR auftrat, belegt, dass es sich um eine Wirkung von extramitochondrialem Ca<sup>2+</sup> handelt. Demnach muss dieses zur Aktivierung der Atmung nicht von den Mitochondrien aufgenommen werden, wie es die klassische Hypothese verlangt. Wie bei Hirnstammmitochondrien, führt überdosiertes Ca<sup>2+</sup> zur Atmungshemmung durch Ca<sup>2+</sup>-Überladung, was durch RR verhindert wurde. Interessanterweise ist die Atmungsgeschwindigkeit in Gegenwart von RR deutlich geringer als in den Ansätzen ohne RR und steigt aber noch weiter an, während diese ohne RR wegen der Ca<sup>2+</sup>-Überladung bereits wieder abnimmt. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass extramitochondriales Ca<sup>2+</sup> ohne RR über der MCU aufgenommen werden kann, was

die Stimulation der Matrix-Dehydrogenasen bewirkt und höhere Atmungsraten ermöglicht. RR verhindert dies und erlaubt zusätzlich den Nachweis weiterer durch extramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkter Atmungssteigerungen. Diese Eigenschaften wurden auch an Mitochondrien, die aus dem gesamten Mäusehirn isoliert wurden, gefunden [67].

Bei der statistischen Auswertung der Experimente (Abbildung 16) ergab sich im Cerebellum ein signifikanter Anstieg der Atmungsraten um den Faktor 2,1, während die Atmungsrate in den Hirnstammmitochondrien nur in geringem Maße aktiviert wurde (Faktor 1,3).

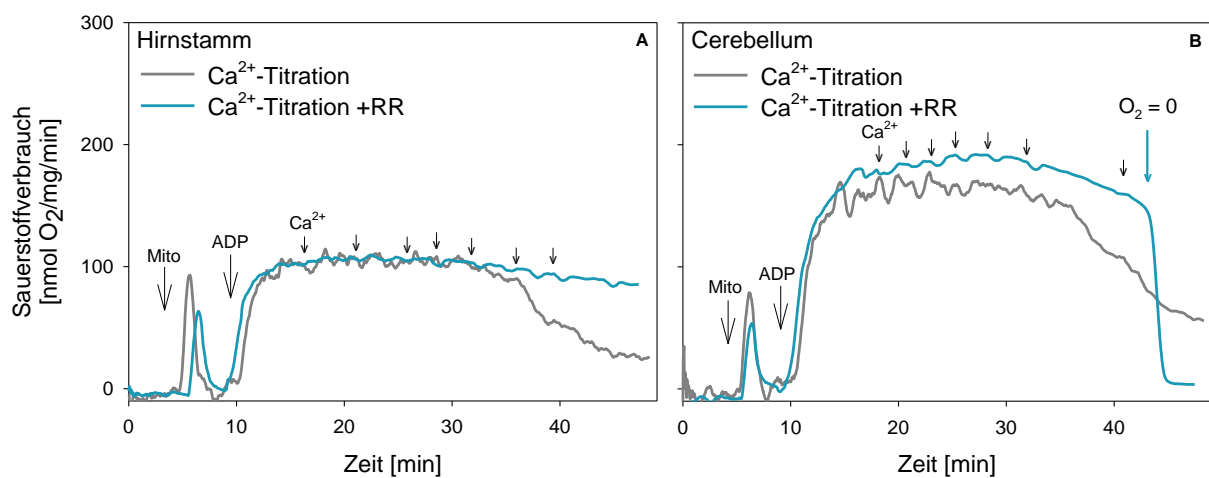
In den Mitochondrien beider Gewebe war dieser Atmungsanstieg mit und ohne RR gleich, was belegt, dass die Glutamat/Malat-Atmung durch extramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden kann. In den bereits erwähnten Einzelmessungen (Abbildung 15B) war jedoch auch eine deutliche Aktivierung durch intramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  nachweisbar, was nur durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den MCU möglich ist. Dass diese Eigenschaft statistisch nicht signifikant war, lag wahrscheinlich an der geringen Anzahl der Experimente.



**Abbildung 16: Statistische Darstellung der Glutamat/Malat- $\text{Ca}^{2+}$ -Titration  $\pm$  Rutheniumrot von Hirnstamm und Cerebellum (Ratte) im Vergleich.**

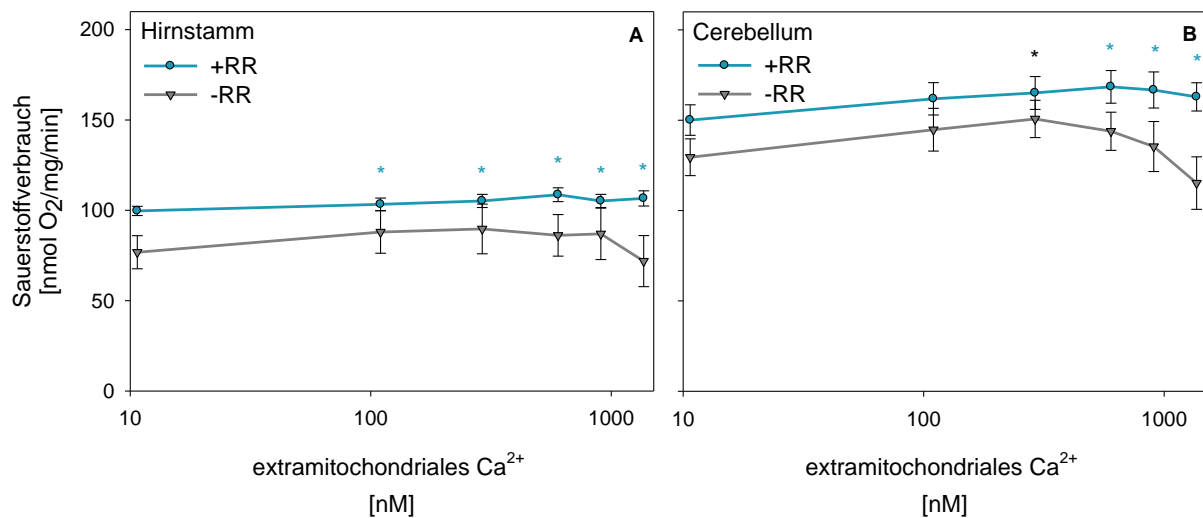
Sauerstoffverbrauch als Mittelwert  $\pm$  SE von 4 Messungen, wie in Abbildung 18 dargestellt und beschrieben. Angegeben wird die extramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in nM. RR, Rutheniumrot (200 nM). \*, signifikante Unterschiede der jeweiligen Atmungsrate im Vergleich zu der Messung ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz mit  $p \leq 0,05$ ; blauer Asterisk, signifikanter Unterschied nur für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration mit RR (blaue Kurve).

Als nächstes wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierbarkeit der Pyruvat/Malat-Atmung (Abbildung 17 und Abbildung 18) von Mitochondrien aus dem Hirnstamm und dem Cerebellum untersucht. Bereits ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz zeigte sich in beiden Regionen eine fast maximale Atmungsgeschwindigkeit unter State-3-Bedingungen, die jedoch durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz um maximal 10 % zur stimulieren war. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Versuche von Szibor et al. und Gellerich et al. [67, 16], die aus Gesamthirnen von Ratte und Maus erhalten wurden. Wie die Glutamat/Malat-Atmung ist auch die Pyruvatatmung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung hemmbar, was durch Rutheniumrot verhindert werden kann.



**Abbildung 17: Regionalspezifische Unterschiede bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration der Pyruvat/Malat-Atmung.**

Inkubation von Rattenmitochondrien isoliert aus Hirnstamm und Cerebellum in EGTA-Medium (BIM-1000) mit 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat, sowie mit und ohne 200 nM RR (Rutheniumrot). Zugaben: Mito, 0,06 mg/ml; ADP, 2 mM ADP;  $\text{Ca}^{2+}$ , die ersten drei Zugaben in 200  $\mu\text{M}$ -Schritten und anschließend in 100  $\mu\text{M}$ -Schritten. Dargestellt werden typische oxygraphische Messkurven, ausgewählt aus 6 Einzelmessungen.



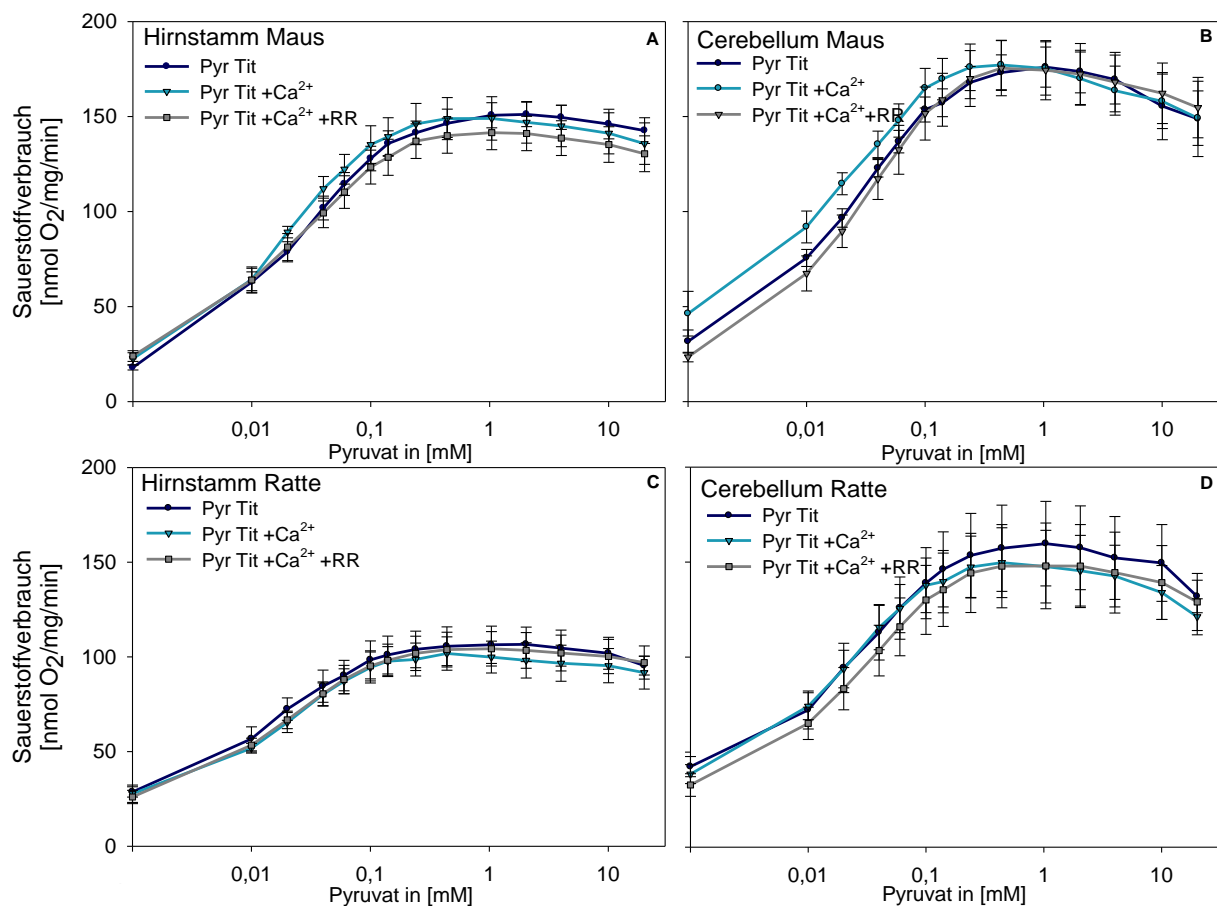
**Abbildung 18: Statistische Darstellung der Pyruvat/Malat- $\text{Ca}^{2+}$ -Titration  $\pm$  Rutheniumrot von Hirnstamm und Cerebellum (Ratte) im Vergleich.**

Sauerstoffverbrauch als Mittelwert  $\pm$  SE von 4 Messungen, wie in Abbildung 20 dargestellt und beschrieben. Angegeben wird die extramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in nM. RR, Rutheniumrot. \*, signifikante Unterschiede der jeweiligen Atmungsrate im Vergleich zu der Messung ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz mit  $p \leq 0,05$ ; blauer Asterisk, signifikanter Unterschied nur für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration mit RR; ns, nicht signifikanter Unterschied.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Titrationen erfolgten bei unphysiologisch hohen Substratkonzentrationen (2 mM Malat, 10 mM Glutamat, 10 mM Pyruvat). Da insbesondere Pyruvat selbst den mitochondrialen Pyruvatdehydrogenasekomplex aktivieren soll, und die Pyruvatkonzentrationen *in vivo* nur um 10  $\mu\text{M}$  liegen [61], wurde noch ein zweites Protokoll ausgewählt, bei dem Pyruvat titriert wurde, um den gesamten Konzentrationsbereich zu untersuchen. Verglichen wurde die minimal mögliche (10 nM) mit einer erhöhten extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (800 nM), bei der  $\text{Ca}^{2+}$  sicher von den Mitochondrien aufgenommen werden kann.

Abbildung 19 stellt die Pyruvat-Titrationen an Hirnstamm- und Cerebellummitochondrien der Maus und der Ratte dar. Mit zunehmender Pyruvatkonzentration kam es erwartungsgemäß zu einem Anstieg der Pyruvatatmung. Der Sättigungsbereich begann bei Konzentrationen ab ca. 200  $\mu\text{M}$  Pyruvat, wobei es bei höheren Konzentrationen zur Substrathemmung kam. In keinem Fall war eine signifikante  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation der Pyruvat-Atmung nachweisbar, da die Kurvenverläufe, insbesondere bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen, praktisch

gleich waren. Weder die  $V_{max}$  noch die Michaeliskonstanten ( $K_M = 18 - 77 \mu\text{M}$  Pyruvat) [51, 64] waren durch Variation der extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen 10 und 800 nM beeinflussbar. Auch die Tabelle 4 zeigt nur äußerst geringe Unterschiede in den Atmungsraten, so dass man nicht von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der mitochondrialen Pyruvatoxidation sprechen kann. Dagegen lässt sich die Geschwindigkeit der Pyruvatverwertung eindeutig durch Änderung der Substratkonzentration regulieren.



**Abbildung 19: Statistische Darstellung der Pyruvat-Titration mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und RR in Ratte und Maus im Vergleich. Fehlender  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluss auf die Pyruvat-abhängige Atmung.**

Inkubation isolierter Mitochondrien in EGTA-Medium (BIM-1000) mit 2 mM Malat und 2 mM ADP (State-3-Atmung) ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz (10 nM  $\text{Ca}^{2+}$ ) und in Gegenwart von 800 nM  $\text{Ca}^{2+}$  mit und ohne 800 nM  $\text{Ca}^{2+}$  und 200 nM RR. Sauerstoffverbrauch als Mittelwert  $\pm$  SE von  $\geq 5$  Messungen. Pyr Tit, Pyruvat Titration ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ; Pyr Tit + $\text{Ca}^{2+}$ , Pyruvat Titration mit  $\text{Ca}^{2+}$  ohne RR; Pyr Tit + $\text{Ca}^{2+}$  +RR, Pyruvat Titration mit  $\text{Ca}^{2+}$  und RR; Die einzelnen  $V_{max}$ -Werte und das jeweilige Ausmaß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation wurden in Tabelle 4 dargestellt. Kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils drei Ansätzen einer ZNS-Region aus einer Spezies.



**Tabelle 4: Übersicht über die durchschnittlichen Maximalwerte der Pyruvattitration.**

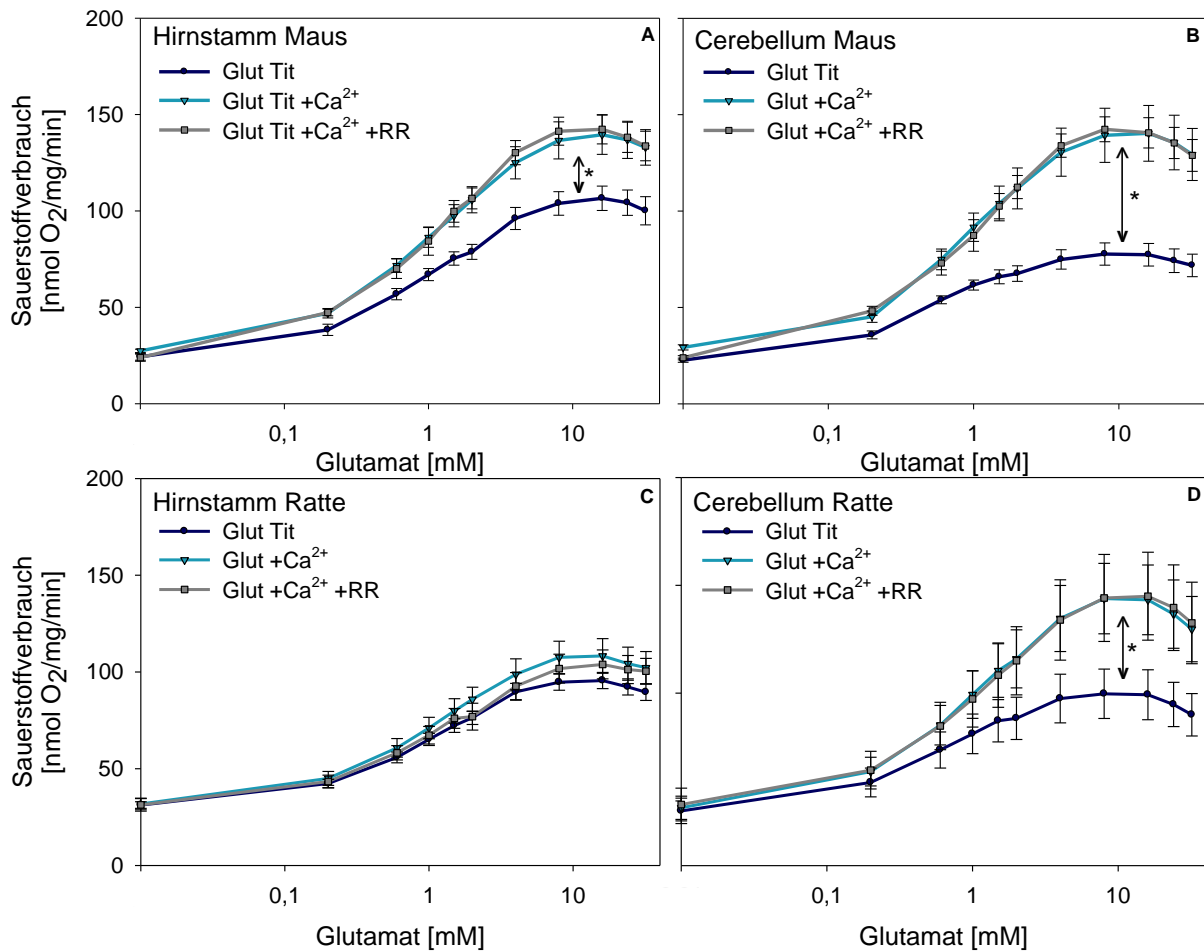
Maximalwerte des Sauerstoffverbrauchs in nmol O<sub>2</sub>/mg/min ± SE von ≥ 6 Messungen. CB, Cerebellum; HS, Hirnstamm; CBM, Cerebellum von Mäusen; HSM, Hirnstamm von Mäusen. Die gemessenen Atmungsraten stammen von den in Abbildung 19 dargestellten Messungen. CB, Cerebellum; HS, Hirnstamm; CBM, Cerebellum von Mäusen; HSM, Hirnstamm von Mäusen. Die Ca<sup>2+</sup>-Stimulation wurde als Differenz der in Gegenwart und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> jeweils höchsten gemessenen Atmungsraten angegeben.

	Pyruvat-Titration -Ca <sup>2+</sup>	Pyruvat-Titration +Ca <sup>2+</sup>	Differenz +/-Ca <sup>2+</sup>	Pyruvat-Titration +Ca <sup>2+</sup> +RR	Differenz +/-RR
CB	159,7 ± 22,2	149,7 ± 18,4	-10,0	148,0 ± 22,5	-1,7
HS	106,6 ± 9,1	101,8 ± 8,8	-4,8	104,3 ± 9,1	+2,5
CBM	176,0 ± 10,5	177,2 ± 13,0	+1,1	175,5 ± 14,5	-1,7
HSM	151,2 ± 6,4	149,0 ± 11,4	-2,1	141,5 ± 9,0	-7,5

Abbildung 20 zeigt die Glutamat-Titrationskurven für Mitochondrien des Hirnstamms und des Cerebellums von Ratten und Mäusen. In allen Fällen erhöhte sich die Atmungsgeschwindigkeit mit zunehmender Glutamatkonzentration. Im Gegensatz zu den Pyruvattitrationen wurden hier die Sättigungsbereiche erst bei Glutamatkonzentrationen von über 5 mM erreicht. Die Titrationskurven bei 800 nM Ca<sup>2+</sup> (mit und ohne RR) zeigten den gleichen Verlauf, was erneut deutlich darauf hinweist, dass die Aktivierung gegenüber den Kurven bei 10 nM Ca<sup>2+</sup> ein rein extramitochondriales Phänomen ist.

Bei der Maus war die V<sub>max</sub> der Glutamat/Malat-Atmung von Hirnstammmitochondrien ohne Ca<sup>2+</sup> deutlich höher als die von Cerebellummitochondrien, weshalb die Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung der Glutamat-Atmung im Cerebellum (Aktivierungsfaktor 1,8) stärker als im Hirnstamm war (Aktivierungsfaktor 1,3). Bei den entsprechenden Versuchen an Rattenmitochondrien war dieser Unterschied noch ausgeprägter: die Glutamat/Malat-Atmung war im Hirnstamm praktisch nicht durch Ca<sup>2+</sup> stimulierbar (Aktivierungsfaktor 1,1), während sich die Mitochondrien des Cerebellums gut aktivieren ließen (Aktivierungsfaktor 1,4). Auch die Tabelle 5 belegt diese gewebsspezifischen Unterschiede der Ca<sup>2+</sup>-Stimulation. Im Cerebellum war die Ca<sup>2+</sup>-Stimulation der Glutamat/Malat-Atmung mindestens doppelt so hoch wie im Hirnstamm und in Mausmitochondrien waren die Stimulationen deutlich höher als in der Ratte. In allen

Fällen hat aber der Zusatz von RR keinen signifikanten Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung.



**Abbildung 20: Statistische Darstellung der Glutamat-Titration mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und RR in Ratte und Maus im Vergleich.**

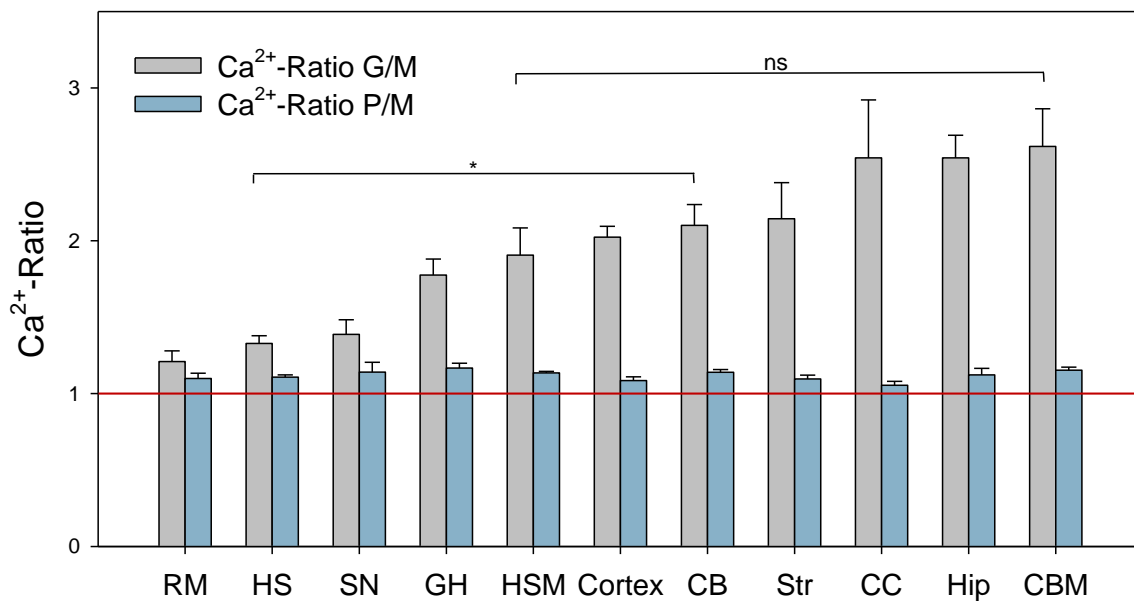
Inkubation isolierter Mitochondrien in EGTA-Medium (BIM-1000) mit 2 mM Malat und 2 mM ADP (State-3-Atmung) ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz (10 nM  $\text{Ca}^{2+}$ ) und in Gegenwart von 800 nM  $\text{Ca}^{2+}$  mit und ohne von 800 nM  $\text{Ca}^{2+}$  und 200 nM RR. Sauerstoffverbrauch als Mittelwert  $\pm$  SE von  $\geq 5$  Messungen. Glu Tit, Glutamat Titration ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ; Glu Tit + $\text{Ca}^{2+}$ , Glutamat Titration mit  $\text{Ca}^{2+}$  ohne RR; Glu Tit + $\text{Ca}^{2+}$  +RR, Glutamat Titration mit  $\text{Ca}^{2+}$  und RR; Die einzelnen  $V_{\max}$ -Werte und das jeweilige Ausmaß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation wurden in Tabelle 5 dargestellt. \*, signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$  mit  $p \leq 0,05$ .

**Tabelle 5: Übersicht über die durchschnittlichen Maximalwerte der Glutamattitration.**

Maximalwerte des Sauerstoffverbrauchs in nmol O<sub>2</sub>/mg/min ± SE von ≥ 6 Messungen. CB, Cerebellum; HS, Hirnstamm; CBM, Cerebellum von Mäusen; HSM, Hirnstamm von Mäusen. Die gemessenen Atmungsraten stammen von den in Abbildung 20 dargestellten Messungen. CB, Cerebellum; HS, Hirnstamm; CBM, Cerebellum von Mäusen; HSM, Hirnstamm von Mäusen. Die Ca<sup>2+</sup>-Stimulation wurde als Differenz der in Gegenwart und Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> jeweils höchsten gemessenen Atmungsraten angegeben.

	Glutamat-Titration -Ca <sup>2+</sup>	Glutamat-Titration +Ca <sup>2+</sup>	Differenz +/-Ca <sup>2+</sup>	Glutamat-Titration +Ca <sup>2+</sup> +RR	Differenz +/-RR
CB	99,7 ± 11,5	143,8 ± 16,3	+44,2	144,9 ± 20,4	+1,1
HS	95,6 ± 4,2	108,3 ± 8,9	+12,7	103,9 ± 7,5	-4,4
CBM	77,7 ± 5,8	140,3 ± 14,5	+62,6	142,4 ± 6,4	+2,1
HSM	106,6 ± 6,3	139,5 ± 10,2	+32,9	142,3 ± 7,6	+2,8

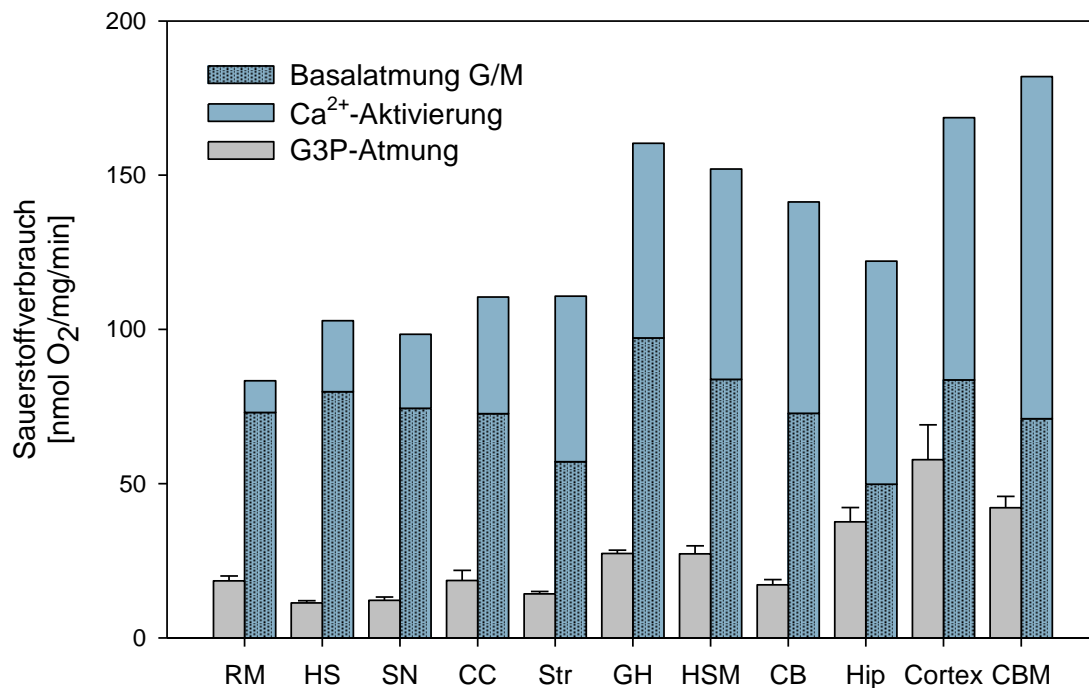
In Abbildung 21 wird das Ausmaß der Stimulation der Glutamat- und Pyruvat-Atmung durch extramitochondriales Ca<sup>2+</sup> in den 11 untersuchten ZNS-Regionen zusammengefasst. Dazu wurden die Ca<sup>2+</sup>-Ratios aus den Experimenten mit Ca<sup>2+</sup>-Titrationen berechnet ( $Ca^{2+} - Ratio = \frac{State-3-Atmung_{Max} + Ca^{2+}}{State-3-Atmung_{Max}}$ ). Während die Ca<sup>2+</sup>-Ratios bei den Titrationen mit Pyruvat und Malat als Substrate (Ca<sup>2+</sup>-Ratio<sub>P/M</sub>) für alle Gewebe ähnlich war (Ca<sup>2+</sup>-Ratio<sub>P/M</sub>: 1,05 – 1,17) traten bei der Ca<sup>2+</sup>-Ratio der Glutamat/Malat-Atmung (Ca<sup>2+</sup>-Ratio<sub>G/M</sub>) deutliche Unterschiede auf (Ca<sup>2+</sup>-Ratio<sub>G/M</sub>: 1,2 – 2,6). Die geringste Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung wurde im Rückenmark, Hirnstamm und in der Substantia Nigra festgestellt und die höchste im Cerebellum der Maus (2,6), im Hippocampus der Ratte (2,5) und im Corpus Callosum der Ratte (2,5).



**Abbildung 21: Darstellung der Ca<sup>2+</sup>-Ratio in Anwesenheit von Glutamat/Malat bzw. Pyruvat/Malat.**

Vergleich der Stimulation der Atmungsrate durch Ca<sup>2+</sup> mit Glutamat/Malat als Substrate (Ca<sup>2+</sup>-Ratio<sub>G/M</sub>) und mit Pyruvat/Malat als Substrate (Ca<sup>2+</sup>-Ratio<sub>P/M</sub>). Ratios als Mittelwerte ± SE von ≥ 5 Messungen (Ausnahme Cortex: 2 Messungen), geordnet nach zunehmender Ca<sup>2+</sup>-Ratio<sub>G/M</sub>. RM, Rückenmark; HS, Hirnstamm; SN, S. Nigra; Brain, Gesamthirn; HSM, Hirnstamm von Mäusen; CB, Cerebellum; Hip, Hippocampus; Str, Striatum; CC, Corpus Callosum; CBM, Cerebellum von Mäusen. \*, signifikante Unterschiede mit p ≤ 0,05; ns, nicht signifikanter Unterschied.

Betrachtet man die maximalen Glutamat/Malat-Atmungsraten in diesen Geweben (Abbildung 22), so findet man ebenfalls beträchtliche Unterschiede. Die geringsten maximalen Atmungsraten finden sich in Mitochondrien aus den eben erwähnten Geweben (Rückenmark, Hirnstamm, Substantia Nigra) während im Cerebellum der Maus sowohl die höchsten Ca<sup>2+</sup>-Ratios als auch Umsatzraten nachgewiesen wurden. Das legt die Vermutung nahe, dass die Ca<sup>2+</sup>-stimulierbare Glutamat/Malat-Atmung mit der maximalen Glutamat/Malat-Atmungsrate zunimmt. Die G3Ph-abhängige Atmung zeigt auch beträchtliche Unterschiede (G3Ph-Atmung: 11,3 – 57,8 nmol O<sub>2</sub>/mg/min), jedoch konnte keine Korrelation mit den Glutamat-abhängigen Atmungsraten nachgewiesen werden.



**Abbildung 22: Regionaler Vergleich der G3P-stimulierten Atmung mit der Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung von Mitochondrien aus den untersuchten ZNS-Regionen von Ratte und Maus.**

Messung der Glutamat/Malat-Atmung durch Ca<sup>2+</sup>-Titrations wie in Abbildung 15 gezeigt. Basalatmung G/M; Atmungsrate zu Beginn der Messungen ohne Ca<sup>2+</sup>-Zusatz. Die jeweils höchste gemessene Atmung ergab die Gesamthöhe der Säulen, während die oberen, hellblauen Abschnitte die jeweilige Atmungsstimulation durch Ca<sup>2+</sup> anzeigen. Die G3P-abhängige Atmung wurde mit dem EGTA-Ansatz, wie in Abbildung 12 dargestellt, gemessen. Sauerstoffverbrauch als Mittelwert in nmol O<sub>2</sub>/mg/min ± SE von ≥ 5 Messungen (Ausnahme Cortex: 2 Messungen) sortiert aufsteigend nach der Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung. G3P-Atmung, G3P-abhängige Atmung. RM, Rückenmark; HS, Hirnstamm; SN, S. Nigra; CC, Corpus Callosum; Str, Striatum; Brain, Gesamthirn; HSM, Hirnstamm von Mäusen; CB, Cerebellum; Hip, Hippocampus; CBM, Cerebellum von Mäusen.

Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, haben Hirnmitochondrien mindestens zwei unabhängige Wege zur Glutamataufnahme, den Ca<sup>2+</sup>-insensitiven Glutamat-Carrier und den Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Aralar. Wenn Mitochondrien zur Erfüllung bestimmter gewebsspezifischer Aufgaben über maximale Aktivitäten des Glutamat-Carriers verfügen, so kann ihre Glutamat/Malat-Atmung bereits ohne Ca<sup>2+</sup>-Stimulation maximal sein, weshalb sie aus Kapazitätsgründen durch Ca<sup>2+</sup>-Zusatz nicht zusätzlich stimuliert werden kann. Das heißt aber wiederum nicht, dass diese Mitochondrien nicht über die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aralar-Reaktion verfügen.

Es wurde deshalb nach einem alternativen Modell gesucht, das die Ca<sup>2+</sup>-Stimulation der Aralar-abhängigen Glutamat/Malat-Atmung ohne Störungen durch die Ca<sup>2+</sup>-

unabhängige Glutamat/Malat-Atmung erfassen kann, was durch schrittweise Supplementierung des minimalen MAS-Modells (Mode 1) mit Substraten und Enzymen des MAS möglich ist.

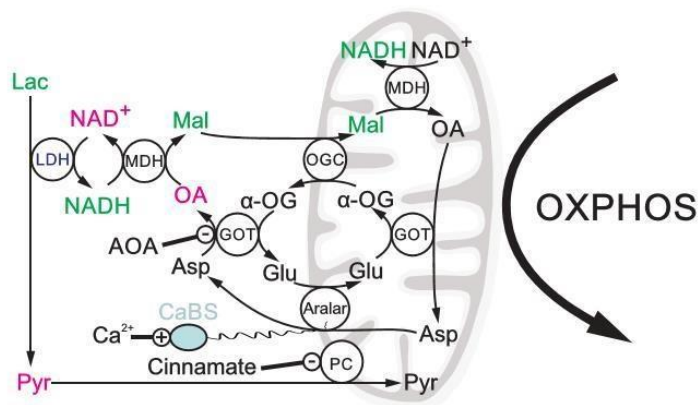
### 3.4 Die $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Pyruvatbereitstellung durch den vollständigen Malat-Aspartat-Shuttle

Zur Überwindung der oben genannten Schwierigkeiten wurde die Komplexität des MAS-Modells stufenweise erhöht (Tabelle 3). In diesem Modellansatz wurden isolierte Mitochondrien mit fast allen Substraten (Laktat, NADH, Malat, Aspartat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Glutamat) des vollständigen MAS versetzt (Mode 2). Die fehlenden Substrate (Pyruvat,  $\text{NAD}^+$ , OA) werden erst nach dem Start der MAS-Reaktionen über die extramitochondrialen Enzymen (GOT, MDH, LDH) gebildet (Mode 3). Wie oben erwähnt, wurden Mitochondrien vom Hirnstamm und vom Cerebellum der Ratte aufgrund der maximalen Unterschiedlichkeit in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit der Glutamat/Malat-Atmung miteinander verglichen. Wenn die fehlende  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation in Hirnstammmitochondrien durch fehlendes Aralar verursacht worden wäre, dann dürften die MAS-Experimente im Mode 3 bei diesen Mitochondrien nicht funktionieren.

Abbildung 24 zeigt die entscheidenden Experimente, welche von M. Kunz und Z. Gizatullina durchgeführt wurden [32]. Die Ansätze mit Mitochondrien von Cerebellum und Hirnstamm enthielten zunächst keine mitochondrialen Substrate und somit bewirkte der ADP-Zusatz kaum eine Atmungssteigerung. Der Zusatz der MAS-Substrate (Mode 2) erlaubte beträchtliche Atmungssteigerungen, die mit Zusatz von extramitochondrialem  $\text{Ca}^{2+}$  (800 nM) deutlich (zwischen 27 und 36%) höher waren als ohne (10 nM  $\text{Ca}^{2+}$ ), was durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung und der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Atmung ermöglicht wurde [17]. Die anschließende Zugabe der MAS-Enzyme (GOT, MDH; Mode 3) löste die MAS-Reaktion aus und bildete zusätzlich zu den vorhandenen Substraten Pyruvat, was die mitochondriale Substratversorgung deutlich verbesserte. Dies wurde anhand der angestiegenen Atmungsgeschwindigkeit erkennbar, die in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  deutlich erhöht war. Wenn dieser Zuwachs der Atmungsrate tatsächlich durch die Pyruvatbereitstellung verursacht wurde, dann müsste die Hemmung der mitochondrialen Pyruvat-Aufnahme durch Cinnamat (Hemmstoff des Pyruvat-Carriers) eine Atmungshemmung verursachen, die tatsächlich eintrat. Cinnamat hemmt jedoch

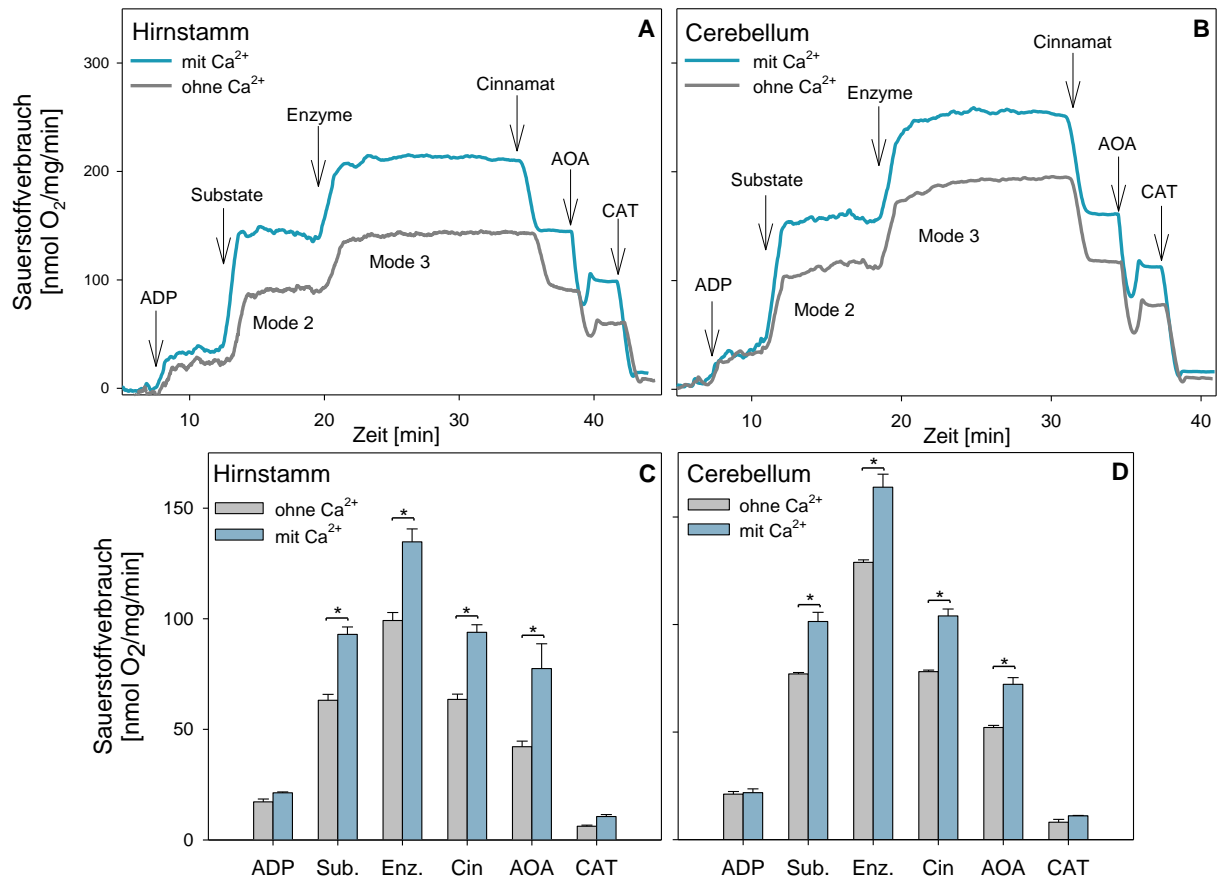
nicht den MAS, der demnach weiter arbeitete bis er durch AOA (Hemmstoff der GOT und somit des MAS) gehemmt wurde. Dies verursachte eine weitere Atmungshemmung, da der Transport reduzierender Äquivalente (Hydridanionen) dadurch unterblieb.

Durch die statistische Auswertung (Abbildung 24CD) wurde ersichtlich, dass in beiden Geweben ein vergleichbares Ausmaß der Pyruvatbildung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation vorliegt. Dieser Befund bestätigt, dass beide Mitochondrienarten die gleiche Ausstattung an MAS-Enzymen besitzen, obwohl sich die einfache  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation der Glutamat-Atmung deutlich unterscheidet (Abbildung 15).



**Abbildung 23: Schematische Darstellung des vollständigen MAS (Mode 3; s. Tabelle 3).**

Der Mode 2 (unvollständiger MAS) wird durch Zusatz der Substrate: α-OG, α-Ketoglutarat bzw. α-Oxoglutarat; Asp, Aspartat; Mal, Malat; Glu, Glutamat, NADH sowie LDH eingestellt. Wie Mode 1 (s. Abbildungen 15 und 16) ist Mode 2 durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierbar. Mode 3 (vollständig rekonstituierter MAS) enthält zusätzlich die Enzyme GOT und MDH des MAS, der dadurch zur Bildung von Oxalacetat (OA), NAD<sup>+</sup> und Pyruvat (Pyr) befähigt wird. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle von Aralar (CaBS) ist in allen 3 Modes die einzige wirksame  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierungsstelle. Cin, Cinnamat [Hemmstoff des Pyruvattransporters (PC)]; AOA, Aminoxyacetat [Hemmstoff der GOT]; OGC, α-Ketoglutarat-Malat-Carrier. Die grünen Substrate zeigen den Weg der Hydridanionen von Laktat zu intramitochondrialem NADH an, welches schließlich durch Komplex I der Atmungskette oxidiert wird.



**Abbildung 24: Das vollständig rekonstituierte MAS-Modell (Mode 3; Tabelle 3) ermöglicht eine Ca<sup>2+</sup>-stimulierbare Veratmung von Pyruvat, das dem Ansatz nicht zugefügt werden muss, sondern direkt aus Laktat gebildet wird.**

**A, B:** Inkubation von Rattenmitochondrien isoliert aus den Modellregionen Hirnstamm und Cerebellum in EGTA-Medium mit den Zusätzen: 5 mM Laktat, 5 I.U./ml LDH, 2 mM Malat und 250  $\mu$ M NADH und 0,06 mg/ml Mitochondrien. Zugaben: ADP, 2 mM ADP; Sub., Substrate: 2 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 2 mM Glutamat, 2 mM Aspartat (Mode 2); Enz., Enzyme: 5 I.U./ml GOT, 5 I.U./ml MDH, (Mode 3); Cin, 1  $\mu$ M Cinnamat (Hemmung der mitochondrialen Pyruvataufnahme); AOA, 2 mM Aminooxyacetat (Hemmung der GOT), CAT, 2,5  $\mu$ M Carboxyatractylosid (Hemmung des AdN-Translokators). Dargestellt werden typische oxygraphische Messkurven, ausgewählt aus  $\geq 8$  Einzelmessungen.

**C, D:** Quantitative Analyse der in Abbildungen A und B gemessenen Atmungsraten. Sauerstoffverbrauch als Mittelwert in nmol O<sub>2</sub>/mg/min  $\pm$  SE von n  $\geq 8$  Messungen. Alle Atmungsraten in Gegenwart von 800 nM Ca<sup>2+</sup> (außer nach Zusatz von ADP) waren signifikant höher im Vergleich zu den Atmungsraten ohne Ca<sup>2+</sup>.

Die im Mode 3 einsetzende Pyruvatbildung nach Enzymzusatz erhöhte signifikant die Atmung im Hirnstamm (um 36,0%) und im Cerebellum (um 39,2%). Der Ca<sup>2+</sup>-Zusatz bewirkte ebenfalls eine signifikante Atmungsstimulation der vollständigen MAS-Ansätze (+Enzyme) im Hirnstamm (um 26,4%) und im Cerebellum (um 21,4%). Die in dieser Abbildung dargestellten Experimente wurden von M. Kunz und Z. Gizatullina durchgeführt [32].

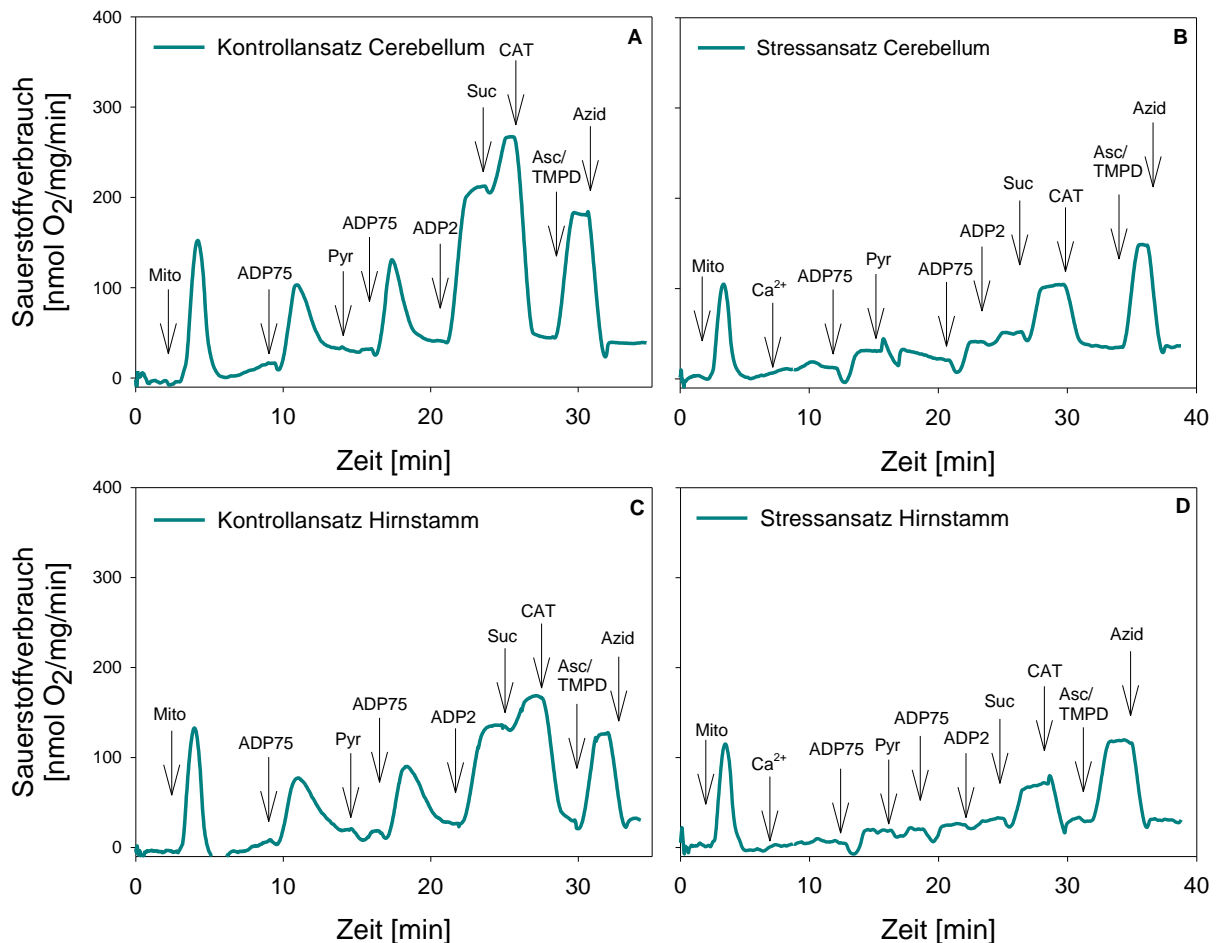


### 3.5 Regionale Unterschiede in der Vulnerabilität der Mitochondrien gegenüber $\text{Ca}^{2+}$ -Stress

Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Titrations (Abbildung 15 und Abbildung 17) zeigte sich, dass die Mitochondrienfunktion durch hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen geschädigt wird, was bei den respirometrischen Messungen durch die sinkenden Atmungsraten erkennbar wird. Es sollte geprüft werden, ob die Mitochondrien verschiedener ZNS-Gewebe eventuell unterschiedlich auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress reagieren.

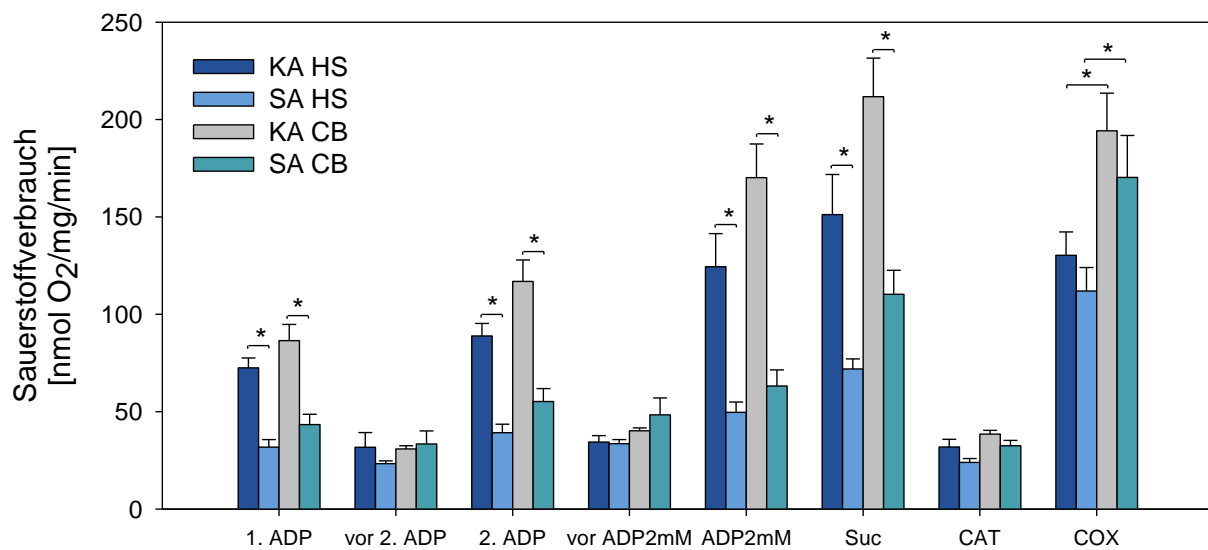
Zu diesem Zweck wurden die aus verschiedenen ZNS-Regionen isolierten Mitochondrien einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress-Prozedur unterworfen. Wie in Abbildung 25 dargestellt, wurden die Mitochondrien in EGTA-freiem Medium (freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ca. 500 nM  $\text{Ca}^{2+}$ ) mit den Substraten Glutamat/Malat respirometrisch ohne (Kontrollansatz) und nach Zusatz von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -Stressansatz) untersucht. Durch Zugabe kleiner ADP-Mengen (75  $\mu\text{M}$  ADP) wurden zunächst kurze State 4-3-4 Übergänge erzeugt, erst ohne und danach mit Pyruvat-Zusatz. Anschließend wurde mit ADP-Überschuss (2 mM) die Komplex-I-abhängige Atmung eingestellt. Durch die darauf folgende Succinat-Gabe konnte dann die durch Komplex III begrenzte Atmung erfasst werden. Nach anschließender Hemmung der phosphorylierenden Atmung mit Carboxyatractylosid (Hemmstoff des AdN-Translokators) wurde abschließend die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase gemessen. Abbildung 28 zeigt die entsprechenden Atmungskurven von Mitochondrien des Cerebellums und des Hirnstamms von Ratten. Man erkennt deutlich, dass die Komplex-I-abhängige Atmung durch 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  stark beeinträchtigt wird. Die durch die ADP-Zusätze verursachten Atmungspeaks der Kontrollkurven (Abbildung 25AC) sind nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress (Abbildung 25BD) verschwunden als Ausdruck der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit der oxidativen Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu erwies sich die Succinatatmung als deutlich stabiler gegenüber der  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe, wenngleich es auch deutliche Hemmungen auf weniger als 50% der Kontrollatmung gab (Abbildung 29). Die nicht-phosphorylierende Atmung nach CAT-Zusatz war interessanterweise gegenüber der Kontrolle fast gar nicht verändert. Demnach kam es kaum zur Entkopplung sondern hauptsächlich zur Hemmung der phosphorylierenden Atmung, was die RCI-Quotienten nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress deutlich verminderte (Abbildung 27). Die nur geringe Abnahme der Cytochromoxidase-abhängigen Atmung nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz (Abnahme zwischen 0 - 20%) belegt die Stabilität dieses Enzyms, die dazu geführt hat, dass man bereits vor 120 Jahren die oxidativen Eigenschaften des

Atmungsferments in humanen Geweben untersuchen konnte, ohne jedoch zu wissen, dass es sich dabei um einen wichtigen Bestandteil der Mitochondrien handelte [60].



**Abbildung 25: Aufzeichnung typischer Oxygraphmessungen zur Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einflusses auf die Mitochondrienfunktion. Untersuchungen an Ratten.**

Inkubation isolierter ZNS Mitochondrien aus Ratten in EGTA-freiem Medium mit 10 mM Glutamat und 2 mM Malat (Kontrollansatz) bzw. in zusätzlicher Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (Stressansatz). Zugaben: Mito, 0,06 mg/ml; ADP75, 75  $\mu\text{M}$ ; ADP2, 2 mM ADP; Pyr; 10 mM Pyruvat; Suc, 10 mM Succinat; CAT, 2,5  $\mu\text{M}$  Carboxyatractylosid; Asc/TMPD, 4 mM Ascorbat + 1 mM TMPD, Azid, 5 mM Azid. Aus den nach Succinatzusatz (state 3) und nach CAT-Zusatz (state 4) gemessenen Atmungsraten wurden die RCI (state 3/state 4)-Werte berechnet und in Abbildung 27 dargestellt.



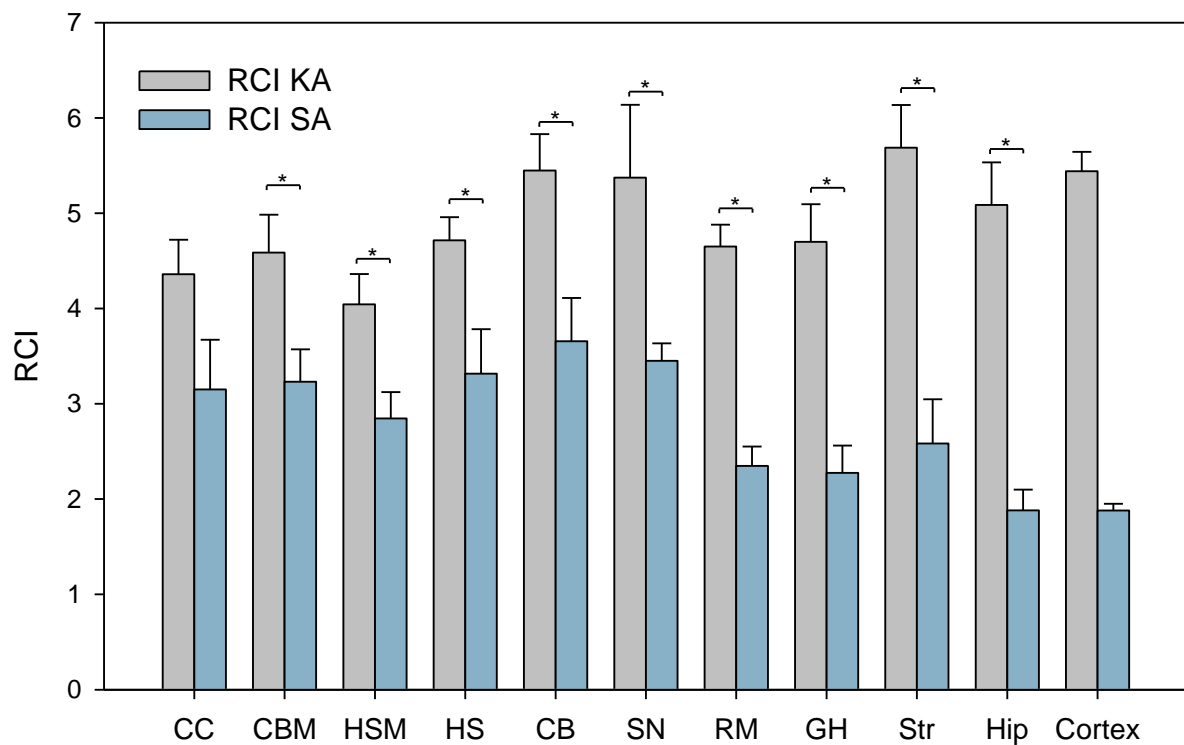
**Abbildung 26: Der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress auf die Funktion von Mitochondrien isoliert aus den Modellregionen Hirnstamm und Cerebellum der Ratte.**

Die Messwerte stammen aus Messungen, wie in Abbildung 25 dargestellt. Sauerstoffverbrauch als Mittelwert in  $\text{nmol O}_2/\text{mg}/\text{min} \pm \text{SE}$  von  $\geq 5$  Messungen (Ausnahme Cortex: 2 Messungen). KA, Kontrollansatz; SA, Stressansatz; HS, Hirnstamm; CB, Cerebellum. \*, signifikante Unterschiede mit  $p \leq 0,05$ .

Um den schädigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einfluss auf die mitochondriale Funktion zu quantifizieren, wurde der Respiratorische Kontrollindex (RCI) der Messungen mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$  miteinander verglichen. Der RCI ist ein Marker für die Funktionsfähigkeit insbesondere isolierter Mitochondrien und wird aus dem Quotient der State-3-Atmung durch die State-4-Atmung berechnet:  $RCI = \frac{\text{State-3-Atmung}}{\text{State-4-Atmung}}$  [8].

Wie Abbildung 27 verdeutlicht, wurde der RCI in Mitochondrien aller Regionen durch Inkubation mit  $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$  signifikant beeinträchtigt. Eine Ausnahme bildete die starke Abnahme des RCI im Cortex, die jedoch aufgrund der geringen Anzahl der Messungen ( $n = 2$ ) nicht signifikant war.

Trotzdem konnten Unterschiede im Schädigungsgrad konstatiert werden. Am stabilsten gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress erwiesen sich die Mitochondrien des Corpus Callosum (-27,7%) und am empfindlichsten die Mitochondrien des Hippocampus (-63,0%) des Cortex (-65,5%).



**Abbildung 27: Auswirkungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress auf den Respiratorischen Kontrollindex (RCI) der aktivierten Atmung von Mitochondrien der untersuchten ZNS-Regionen.**

Die Daten wurden aus den in Abbildung 25 gezeigten Experimenten berechnet. RCI Mittelwerte  $\pm$  SE von  $\geq 5$  Präparationen (Ausnahme Cortex: 2 Präparationen). GH, Gesamthirn; RM, Rückenmark; CB, Cerebellum; HS, Hirnstamm; CC, Corpus Callosum; SN, S. Nigra; Hip, Hippocampus; Str, Striatum; CBM, Cerebellum von Mäusen; HSM, Hirnstamm von Mäusen; KA, Kontrollansatz; SA, Stressansatz. \*, signifikante Unterschiede mit  $p \leq 0,05$ .

## 4 Diskussion

Neurodegenerative Erkrankungen sind häufig mit mitochondrialer Dysfunktionen und Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase verbunden, wobei die Lokalisation und die Art der Erstmanifestation sehr unterschiedlich sind [5, 66]. Unterschiedliche mitochondriale Eigenschaften werden herangezogen, um die Vulnerabilität bestimmter ZNS-Regionen sowie die unterschiedliche Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen z.B. mit CsA als Mitochondrienschutz zu erklären [19].

Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, ist die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ ) ein Signalgeber, der eine Vielzahl von zellulären Einzelprozessen des Energiestoffwechsels steuert und koordiniert. Dementsprechend aktiviert  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  unter anderem sowohl die Zellarbeit als auch die mitochondriale Substratoxidation. Wenn  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  in der intakten Zelle vermindert wird, so vermindern sich sowohl der Substratzufluss zur OXPHOS als auch die Menge des bei der Zellarbeit entstehenden ADP. Aus diesem Grund ist es schwierig, in intakten Zellen den reinen Einfluss des Substratzufusses auf die OXPHOS zu untersuchen. Bei isolierten Mitochondrien lässt sich durch Zusatz von überschüssigem ADP zuverlässig eine maximale Arbeitsleistung mit maximaler OXPHOS-Rate einstellen. Demzufolge hängt die Atmungsrate der isolierten Mitochondrien nur vom Substratzufluss und von dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation ab. Andererseits ist die Substratversorgung der Mitochondrien eine Aufgabe der gesamten Zelle, weshalb parallele Untersuchungen von Modellen verschiedener Integrationsebenen notwendig sind (Tabelle 3).

Durch Inkubation isolierter Mitochondrien mit Substraten und Enzymen des vollständigen MAS (Mode 3, s. Tabelle 3) wird die präzise Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bereitstellung von Pyruvat für die OXPHOS möglich. Mit diesem Modell gelang Gellerich et al. [16] der Nachweis, dass das mitochondriale Gaspedal bei Hirn- und Herzmitochondrien für die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierbare Pyruvatversorgung verantwortlich ist. Dies gelang im Vergleich dieses MAS-Modells mit einfacheren (isolierte Mitochondrien, inkubiert mit Glutamat/Malat oder Pyruvat/Malat (Mode 1)) und auch mit komplexeren Modellen (Synaptosomen, intakten Zellen wie Fibroblasten, Neuronen und Thymozyten) sowie auch am intakten perfundierten Herzen. Dabei wurde der MAS sowohl pharmakologisch mit AOA gehemmt als auch mit Hilfe von BAPTA über die Absenkung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermindert. Die dadurch verminderten Atmungsraten konnten danach durch Zusatz

von Pyruvat wieder erhöht werden, da dieses leicht über die Zellmembran aufgenommen werden kann. Anschließend konnte die Atmung durch Hemmung des mitochondrialen Pyruvatcarriers mit Cinnamat erneut gehemmt werden [67].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Frage, wieso es ZNS-Mitochondrien gibt (bspw. Hirnstamm der Ratte) deren Glutamat/Malat-Atmung (Mode 1) sich durch  $\text{Ca}^{2+}$  praktisch nicht aktivieren lässt. Sollten diese Mitochondrien über keine Möglichkeit verfügen ihre Pyruvatzufuhr  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig zu erhöhen? Sollte bei solchen Mitochondrien eventuell die klassische intramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung kompensatorisch stärker ausgeprägt sein als bei Mitochondrien anderer Regionen?

Diese Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit an Mitochondrien aus 9 verschiedenen ZNS Regionen beantwortet werden, an denen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Verwertung von Pyruvat und Glutamat untersucht wurde.

#### 4.1 Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ auf die mitochondriale Pyruvatatmung

Die Pyruvat-abhängige Atmungsgeschwindigkeit betrug in allen untersuchten ZNS-Regionen bei minimaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (10 nM) bereits mindestens 85% der maximal möglichen Geschwindigkeit (Abbildung 21). Demnach lassen sich durch Variation der extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nur Atmungsgeschwindigkeiten zwischen 85 und 100% der maximal möglichen Pyruvatatmung einstellen. Um eine bereits während der Präparation stattgefundenen Aktivierung der Matrixenzyme durch mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme auszuschließen bzw. vorzubeugen, enthielten die Medien für die Mitochondrienisolation EGTA. Dadurch geben die Mitochondrien ihr Matrix- $\text{Ca}^{2+}$  wieder ab [15]. Darüber hinaus konnte durch Pyruvattitrationen bei zwei verschiedenen extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (10 nM und 800 nM) gezeigt werden, dass sowohl im physiologischen Konzentrationsbereich von Pyruvat (um 10  $\mu\text{M}$ ) [61] als auch bei unphysiologisch hohen Konzentrationen tatsächlich keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der mitochondrialen Pyruvatverwertung aufgetreten ist.

Diese Resultate bestätigen und erweitern frühere Ergebnisse von Gellerich et al., die an Hirnmitochondrien von Ratte und Maus durchgeführt wurden. Es wurde eine abnehmende Tendenz zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung für die Substrate Glutamat/Malat (271%) >  $\alpha$ -Ketoglutarat (167%) > Isocitrat/Malat (155%) > Pyruvat (116%) gefunden [17].

Diese Ergebnisse stehen zwar im Widerspruch zur klassischen Theorie der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation, aber nicht zu den experimentellen Ergebnissen, die zu dieser Theorie geführt haben.

Auch McCormack et al. [42] schreibt in seinem Review, dass in isolierten Herzmitochondrien normal gefütterter Ratten keine  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingte Steigerung der Atmungsgeschwindigkeit nachgewiesen werden kann, da die PDH schon in Ruhe eine sehr hohe Aktivität besitzt und durch  $\text{Ca}^{2+}$  nur noch geringgradig stimuliert werden kann. Der funktionelle Nachweis dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung gelingt somit nur an Hungerratten, die 48 Stunden vor Versuchsbeginn nicht mehr gefüttert werden und aufgrund der Umstellung auf Hungerstoffwechsel mit Pyruvat sparsamer umgehen müssen. Deshalb kann die bei Hungertieren inaktivierte PDH durch  $\text{Ca}^{2+}$  so stark aktiviert werden kann, dass es in diesem Fall auch zu einer spürbaren Steigerung der Atmungsgeschwindigkeit kommt.

Außerdem besagt die metabolische Kontrolltheorie eindeutig, dass die Erhöhung der Aktivität eines Einzelschrittes innerhalb einer Reaktionskette nicht gleichbedeutend sein muss, mit einer Erhöhung des Durchsatzes durch die gesamte Reaktionskette [28, 24].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine wirksame Regulation der mitochondrialen Pyruvatverwertung einfach durch Verminderung der Pyruvatkonzentration erreicht werden kann, wobei der Regelbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Pyruvat liegt (Abbildung 19, Tabelle 4). Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von Kauppinen und Nicholls (1986) [29], die durch Pyruvattitrations an Substrat entleerten Synaptosomen fanden, dass die mitochondriale Pyruvatverwertung nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden kann. Auch neuere Untersuchungen an Herzmitochondrien mit und ohne MCU ergaben ähnliche Ergebnisse, die belegen, dass es den klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierungsmechanismus zwar gibt, dass dieser aber in seinem Ausmaß und seiner biologischen Bedeutung überschätzt wurde [67]. Erst mit der Erzeugung der MCU-KO Mäuse wurde den Anhängern der klassischen Hypothese dieses Problem deutlich. Man begann nach alternativen Wegen zu suchen, auf denen extramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien gelangen könnte. Für die Anhänger des Gaspedalmechanismus waren die MCU-KO Mäuse der lebende Beweis für die Richtigkeit der neuen Hypothese.

## 4.2 Einfluss von $\text{Ca}^{2+}$ auf die mitochondriale Glutamat/Malat-Atmung

Als wichtige Voraussetzung für die Existenz des MAS-getriebenen Gaspedalmechanismus wurde der Nachweis angesehen, nach dem die Glutamat/Malat-Atmung der entsprechenden Mitochondrien durch extramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  stimulierbar ist. In dieser Studie konnte die Vorversuche bestätigend gezeigt werden, dass die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung in den einzelnen ZNS-Regionen sehr unterschiedlich ausfällt. Die stärkste Aktivierung wurde im Cerebellum der Maus ( $\text{Ca}^{2+}$ -Ratio<sub>G/M</sub> 2,6) festgestellt und die geringste im Rückenmark und im Hirnstamm der Ratte ( $\text{Ca}^{2+}$ -Ratio<sub>G/M</sub> 1,2 und 1,3). Beide Gewebe wurden deshalb als Testgewebe verwendet, um die Ursache und biologische Bedeutung dieser Unterschiede durch weitergehende Untersuchungen aufzuklären.

Eine Hypothese zu diesem Phänomen wäre, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Hirnstammmitochondrien nicht durch den MAS sondern über den G3PS erfolgt und dass diese somit über ein G3PS-getriebenes Gaspedal in stärkerem Maße als im Cerebellum verfügen. Jedoch zeigte sich, dass die G3P-vermittelte Atmung in Hirnstammmitochondrien (11,3 nmol  $\text{O}_2$ /mg/min) sogar kleiner ist als in Cerebellummitochondrien (17,2 nmol  $\text{O}_2$ /mg/min). Demnach ist diese Erklärungsmöglichkeit wenig wahrscheinlich.

Eine weitere Hypothese wäre, dass Mitochondrien im Hirnstamm wie die anderen ZNS-Mitochondrien über ein normales (MAS-)Gaspedal verfügen, was aber mit der Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung (Mode 1) nicht nachweisbar ist, da sie bereits ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz eine hohe Glutamat-Atmung besitzen.

Wenn man die Ergebnisse von den Hirnstammexperimenten der Ratte genauer betrachtet, fällt auf, dass die maximale Komplex-I-abhängige Atmung  $102,2 \pm 5,2$  nmol  $\text{O}_2$ /mg/min (Abbildung 13) betrug. Die noch nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte Glutamat/Malat-Atmung betrug dagegen bereits  $95,6 \pm 4,2$  nmol  $\text{O}_2$ /mg/min (entsprechend 93,5% der maximalen Komplex-I-Atmung), weshalb diese Atmung durch  $\text{Ca}^{2+}$  nur noch leicht auf  $108,3 \pm 8,9$  nmol  $\text{O}_2$ /mg/min zu steigern war (s. Tabelle 5). Demnach war aufgrund der Enzymausstattung der Hirnstammmitochondrien keine nennenswerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Steigerung der Glutamat-abhängigen Atmung möglich.



Das Gegenteil ist bei den cerebellären Rattenmitochondrien der Fall. Die Komplex-I-abhängige Atmung ( $V_{\max} = 151,7 \pm 10,8 \text{ nmol O}_2/\text{mg}/\text{min}$ ) war durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitive Glutamat/Malat-Atmung ( $99,7 \pm 11,4 \text{ nmol O}_2/\text{mg}/\text{min}$ ) nur zu 65,7% der  $V_{\max}$  ausgenutzt. Demzufolge war die  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingte Steigerung der Glutamat/Malat-Atmung auf  $143,8 \pm 16,3 \text{ nmol O}_2/\text{mg}/\text{min}$  gut nachweisbar.

Dementsprechend bewirkt  $\text{Ca}^{2+}$  auch im Hirnstamm der Ratte eine Aktivierung der Aralar-Reaktion, jedoch kommt es wegen der begrenzten Kapazität von Komplex I nicht zu einer Atmungssteigerung, sondern wahrscheinlich zu einer Umverteilung der aktuellen Glutamatlieferung von der bereits aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Glutamatverwertung über Aralar. Wie in Kapitel 1.4 ausgeführt, ist die Aralar-Reaktion gegenüber den beiden anderen Transportmöglichkeiten für Glutamat energetisch begünstigt. Somit wird durch den Anstieg der extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitive Glutamattransport durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven ersetzt, ohne dadurch eine Steigerung der Atmungsrate zu bewirken. Mit dieser Hypothese lassen sich auch die beobachteten Unterschiede in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Glutamat/Malat-Atmung zwischen Ratte und Maus erklären. Demnach wäre die Ausstattung der Mausmitochondrien mit den Enzymen des  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Glutamatstoffwechsels im Verhältnis zu denen des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aralar-vermittelten Glutamatstoffwechsels etwas geringer als bei Ratten. Der Gaspedalmechanismus scheint jedoch in Hirnmitochondrien der Maus in ähnlicher Intensität zu funktionieren, wie bei Ratten [67]. Ein Beweis für diese Hypothese wurde mit dem unten diskutierten Modell des rekonstituierten MAS erbracht.

#### 4.3 Gleiche Ausprägung der Gaspedal-abhängigen Atmung im Hirnstamm und im Cerebellum

Zur Prüfung der oben vorgestellten Hypothese, nach der alle ZNS-Regionen über die gleiche Fähigkeit verfügen, mit Hilfe des vollständigen MAS bei Bedarf  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Pyruvat zu bilden (mitochondriales Gaspedal), wurden MAS-Modelle höherer Komplexität (Mode 2 und 3) verwendet. Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, kann durch den Gaspedalmechanismus aus Laktat oxidativ Pyruvat gebildet werden, was aber nur möglich ist, wenn der MAS NADH zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert und zu diesem Zweck in der gleichen Menge Glutamat über Aralar in die Mitochondrien transportiert wird. Demnach kann die Pyruvatbildung als Indikator für die mit gleicher Geschwindigkeit ablaufende Aralar-Reaktion angesehen werden. Dass bei der MAS-Reaktion im

Mode 3 tatsächlich Pyruvat gebildet wird, kann mit Cinnamat, einem hochspezifischen Hemmstoff des mitochondrialen Pyruvat-Carriers, belegt werden [52] (Abbildung 23).

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluss ziehen, dass die Geschwindigkeit der mitochondrialen Pyruvatverwertung für die OXPHOS im Wesentlichen über die zytosolische Pyruvatkonzentration reguliert wird. Diese liegt im Bereich zwischen 10 und 100  $\mu\text{M}$  Pyruvat. In diesem Bereich bewirkt jede Konzentrationsänderung eine entsprechende Änderung der mitochondrialen Pyruvataufnahme mit anschließender Metabolisierung in den Mitochondrien. Da die Aktivierung des MAS-Enzyms (Aralar) durch eine an der Außenseite der mitochondrialen Innenmembran befindliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle realisiert wird, ergibt sich die Abhängigkeit der Pyruvatbildungsgeschwindigkeit von der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Durch zwei Modelle konnte gezeigt werden, dass diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der OXPHOS nicht des  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritts in die Mitochondrien bedarf. Sowohl mit pharmakologisch gehemmtem MCU (durch RR) als auch mit gentechnisch ausgeschaltetem MCU (MCU-Knock Out) [67] ergeben sich die gleichen Ergebnisse. Beim sorgfältigen Vergleich verschiedener Modellsysteme, wurde festgestellt, dass der Gaspedalmechanismus ca. 85% der mitochondrialen Substratzufuhr reguliert. Aus diesem Grund ist für Modellmäuse ohne MCU ein nahezu normales Leben möglich. Diese sind zu etwa 10% kleiner als die Wildtyp-Mäuse, können unter moderaten Lebensbedingungen gut leben, lernen, sich orientieren, sich fortpflanzen und auch moderate Muskelarbeit leisten. Jedoch zeigen sie signifikante Abnahmen der maximalen Arbeitsfähigkeit. Sie schwimmen beispielsweise um 10% langsamer als normale Mäuse und sind bei Kampf/Flucht-Reaktionen deutlich eingeschränkt [27, 49, 58]. Weiterhin konnte bei detaillierten Untersuchungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung klar gezeigt werden, dass diese größtenteils durch den Gaspedalmechanismus erfolgt und nur zu einem geringen Teil durch den klassischen Mechanismus [67, 16].

#### 4.4 $\text{Ca}^{2+}$ -Stress

Im Rahmen dieser Studie wurde die Mitochondrienfunktion auch bei hohen, schädigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen untersucht. Es wurde beobachtet, dass die Inkubation der Mitochondrien in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zu deutlichen

Verminderungen besonders der Komplex-I-abhängigen Atmungsraten führte, während die Komplex-II-Atmung weniger betroffen war. Deshalb ist die Abnahme der Komplex-I- und Komplex-II-abhängigen Atmung (die zur RCI-Berechnung benutzt wurde) besonders auf die Verminderung der Komplex I-Atmung zurückzuführen. Die RCIs zeigten eine Minderung um 27 - 57%. Ähnliche Ergebnisse sind bei Gizatullina et al. [19] zu finden, die Mitochondrien aus Cortex, Striatum, Hippocampus, Cerebellum und S. Nigra miteinander verglichen, deren RCIs um 45 - 56% abnahmen. Bei letzteren Untersuchungen war das Ausmaß der Schädigungen im Durchschnitt stärker, was vielleicht daran lag, dass Gizatullina et al. [19] die RCI-Werte aus den Daten der Glutamat/Malat-Atmung berechneten, während in der vorliegenden Arbeit die Glutamat/Malat/Pyruvat/Succinat-Atmung verwendet wurde, die im Gegensatz zu den Messungen von Gizatullina et al. [19] auch die stabilere Succinatatmung enthält. Für diese Testbedingungen ergaben sich, wie in Abbildung 27 ersichtlich, beträchtliche regionale Unterschiede in der Stabilität der isolierten Mitochondrien gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress.

Wie Gizatullina et al. [19] deutlich zeigen konnten, verhindert CsA die  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingte Schädigung von Hirnmitochondrien vollständig. Dabei schützt CsA die Mitochondrien nicht direkt vor mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, sondern nur vor der Öffnung der *Permeability Transition Pore*, die durch die Erhöhung der intramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt wird [6]. Im Gegensatz dazu hemmt RR bereits die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und schützt somit ebenfalls vor  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung [67]. Damit gibt es zwei effektive Möglichkeiten, um die Mitochondrien vor  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung wie beispielsweise bei Neurodegeneration zu schützen. Der Einsatz von CsA für diesen Zweck war aufgrund seiner immunologischen Hauptwirkung umstritten, weshalb modifizierte CsA-Derivate entwickelt wurden, die keine immunologische Wirkung besitzen [19]. Der Einsatz von RR war ebenfalls umstritten, weil dadurch vermeintlich die Regulation der mitochondrialen Substratversorgung gehemmt wäre. Trotzdem wurde die protektive Wirkung von RR am perfundierten Rattenherz untersucht [53, 34].

Gizatullina et al. [16] stellten fest, dass der Gaspedalmechanismus auch in Gegenwart von RR funktioniert. Aufgrund der dabei ausbleibenden intramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung (klassischer Mechanismus) muss die extramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, um die fehlenden 15% Aktivierung zu

ermöglichen, auf Konzentrationen ansteigen, die bei ungeschützten Mitochondrien bereits vollständige Schädigungen verursachen [16].

#### 4.5 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Konzept des mitochondrialen Gaspedals, welches die Aktivierung der MAS-vermittelten Pyruvatbereitstellung durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  ohne vorherige  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme über den MCU beinhaltet, an bisher nicht untersuchten ZNS-Regionen (bspw. Rückenmark etc.) überprüft werden. Außerdem bestätigte sich das geringe Ausmaß der klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der mitochondrialen Pyruvatverwertung (<15%) durch intramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$ . Im Gegensatz dazu war die Glutamat/Malat-Atmung von Mitochondrien des Cerebellums auf bis zu 210% zu steigern. Das Ausmaß dieser Atmungssteigerung war jedoch in den verschiedenen Regionen sehr unterschiedlich und betrug im Hirnstamm der Ratte nur 130%. Da es in ZNS-Mitochondrien mindestens 2 Aufnahmewege für Glutamat gibt ( $\text{Ca}^{2+}$ -sensitives Aralar,  $\text{Ca}^{2+}$ -insensitiver Glutamat-Carrier und Glutamat-Transporter EAAT1), die in den verschiedenen Regionen unterschiedlich ausgeprägt sind, gibt es Regionen, in denen die Glutamat-Carrier-abhängige Atmung bereits so hoch ist, wie die maximal mögliche Glutamat/Malat-Atmung. Aus diesem Grund lässt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der Aralaratmung keine weitere Erhöhung der Atmung zu. Dagegen war es mit dem Modell des vollständigen MAS möglich, die Existenz des Gaspedalmechanismus auch in Hirnstamm-mitochondrien nachzuweisen und dadurch einen Beleg für die Allgemeingültigkeit des Gaspedalkonzepts in verschiedenen ZNS-Regionen zu erbringen. Demnach erfolgt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Substratbereitstellung für die OXPHOS über zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  durch das mitochondriale Gaspedal. Die klassische Aktivierung über intramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  ist dagegen nur dann erforderlich, wenn maximale Arbeitsleistungen zu verrichten sind. Aus diesem Grund können nun Hemmstoffe des MCU wie Rutheniumrot und moderne Analoga zur Prophylaxe vor  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress in Betracht gezogen werden, die früher als nicht anwendbar galten.

Das Verständnis der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der OXPHOS ist Voraussetzung für therapeutische oder sogar auch präventive Ansätze bei neurodegenerativen Erkrankungen, die von mitochondrialer Dysfunktion und gestörter  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase begleitet werden.

## 5 Zusammenfassung

Schon seit Jahrzehnten sind sowohl aktivierende als auch schädigende Wirkungen von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Mitochondrien bekannt. Rätselhaft und unklar erschien jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung der mitochondrialen Substratversorgung. Im Gegensatz zur klassischen Hypothese, nach der zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU) in den mitochondrialen Matrixraum gelangen muss, um dort die Substratoxidation zu aktivieren, fanden Gellerich et al. [17], dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation extramitochondrial über den vollständigen Malat-Aspartat-Shuttle erfolgt. Bei steigender zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch das sogenannte mitochondriale Gaspedal vermehrt Pyruvat gebildet, welches anschließend von den Mitochondrien aufgenommen wird, um das infolge steigender Zellarbeit vermehrt anfallende ADP zu ATP phosphorylieren zu können.

Der Gaspedalmechanismus wird durch die besonderen Eigenschaften des mitochondrialen Glutamat-Aspartat-Carriers (Aralar) realisiert, dessen Glutamat-Transportrate in die Mitochondrien durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  um bis zu 300% aktiviert werden kann. Dieser Mechanismus wurde an Mitochondrien aus gesamten Hirnen gefunden [17]. Nun fanden sich an Mitochondrien aus verschiedenen ZNS-Regionen unterschiedliche und z.T. sogar gar keine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Atmungssteigerungen. Sollten diese Mitochondrien über kein Gaspedal verfügen?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Mitochondrien aus 9 verschiedenen ZNS-Regionen von Ratten und Mäusen auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit der Veratmung von Glutamat/Malat und Pyruvat/Malat untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Pyruvat/Malat-Atmung in allen ZNS-Regionen bereits bei minimaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration fast die maximal mögliche Geschwindigkeit erreicht hatte, während bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe nur geringe oder gar keine Atmungssteigerungen mehr auftraten.

Durch Voruntersuchungen wurden 2 typische Regionen (Cerebellum und Hirnstamm) ausgewählt, die sich besonders in der  $\text{Ca}^{2+}$  Aktivierung der Glutamat/Malat-Atmung unterschieden: Anders als im Cerebellum, dessen Mitochondrien sich wie diese aus dem Gesamthirn verhielten, wurde in Hirnstammmitochondrien gefunden, dass die Glutamat/Malat-Atmung kaum durch  $\text{Ca}^{2+}$  stimulierbar war, da diese bereits über eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Glutamat/Malat-Atmung verfügen.

Der Hemmstoff des MCU, Rutheniumrot, der die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme hemmt, hatte praktisch keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation der mitochondrialen

Atmung. Das bedeutet, dass  $\text{Ca}^{2+}$  nicht in die Mitochondrien gelangen muss, um bis zu 85% die OXPHOS regulieren zu können. Um jedoch die maximale Rate der OXPHOS erreichen zu können, ist der klassische Mechanismus der Aktivierung durch intramitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  erforderlich.

Aus diesem Grund können Hemmstoffe der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme zur Prophylaxe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Stress bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden, was früher aufgrund vermuteter Beeinträchtigungen der Regulation der OXPHOS nicht in Betracht gezogen werden konnte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abbrescia DI, La Piana G, Lofrumento NE (2012) Malate-aspartate shuttle and exogenous NADH/cytochrome c electron transport pathway as two independent cytosolic reducing equivalent transfer systems. *Arch Biochem Biophys* 518(2): 157–163
2. Amoedo ND, Punzi G, Obre E, Lacombe D, Grassi A de, Pierrri CL, Rossignol R (2016) AGC1/2, the mitochondrial aspartate-glutamate carriers. *Biochim Biophys Acta* 1863(10): 2394–2412
3. Balaban RS (2002) Cardiac Energy Metabolism Homeostasis. Role of Cytosolic Calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34(10): 1259–1271
4. Balaban RS (2009) The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta* 1787(11): 1334–1341
5. Beal MF (2000) Mitochondria and the pathogenesis of ALS. *Brain* 123 (Pt 7): 1291–1292
6. Bernardi P, Colonna R, Costantini P, Eriksson O, Fontaine E, Ichas F, Massari S, Nicolli A, Petronilli V, Scorrano L (1998) The mitochondrial permeability transition. *BioFactors* 8(3-4): 273–281
7. Chalmers S, Nicholls DG (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem* 278(21): 19062–19070
8. Chance B, Williams GR (1955) Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation: III. The Steady State. *J Biol Chem*: 217–428
9. Contreras L, Gomez-Puertas P, Iijima M, Kobayashi K, Saheki T, Satrústegui J (2007) Ca<sup>2+</sup> Activation kinetics of the two aspartate-glutamate mitochondrial carriers, aralar and citrin: role in the heart malate-aspartate NADH shuttle. *J Biol Chem* 282(10): 7098–7106
10. Dennis SC, Clark JB (1977) The Pathway of Glutamate Metabolism in Rat Brain Mitochondria: 521–527
11. Deussen A (2017) Klinische Relevanz des Energiestoffwechsels im Herzen. *Z Herz- Thorax-Gefäßchir* 31(5): 357–363
12. Dubinsky JM (2009) Heterogeneity of nervous system mitochondria: location, location, location! *Exp Neurol* 218(2): 293–307
13. Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE (2002) Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* 277(22): 19289–19294
14. Friberg H, Connern C, Halestrap AP, Wieloch T (1999) Differences in the activation of the mitochondrial permeability transition among brain regions in the rat correlate with selective vulnerability. *Journal of Neurochemistry* 72(6): 2488–2497
15. Gellerich FN, Gizatullina Z, Arandarcikaite O, Jerzembek D, Vielhaber S, Seppet E, Striggow F (2009) Extramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the nanomolar range regulates glutamate-dependent oxidative phosphorylation on demand. *PLoS ONE* 4(12): e8181
16. Gellerich FN, Gizatullina Z, Gainutdinov T, Muth K, Seppet E, Orynbayeva Z, Vielhaber S (2013) The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium. *The mitochondrial gas pedal. IUBMB Life* 65(3): 180–190
17. Gellerich FN, Gizatullina Z, Trumbekaite S, Korzeniewski B, Gaynutdinov T, Seppet E, Vielhaber S, Heinze H-J, Striggow F (2012) Cytosolic Ca<sup>2+</sup> regulates the energization of isolated brain

- mitochondria by formation of pyruvate through the malate-aspartate shuttle. *Biochem J* 443(3): 747–755
18. Gellerich FN, Kapischke M, Kunz W, Neumann W, Kuznetsov A, Brdiczka D, Nicolay K (1994) The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. In: Saks VA, Ventura-Clapier R (eds) *Cellular Bioenergetics: Role of Coupled Creatine Kinases*, vol 905. Springer US, Boston, MA, pp 85–104
  19. Gizatullina ZZ, Gaynutdinov TM, Svoboda H, Jerzembek D, Knabe A, Vielhaber S, Malesevic M, Heinze H-J, Fischer G, Striggow F, Gellerich FN (2011) Effects of cyclosporine A and its immunosuppressive or non-immunosuppressive derivatives D-Ser8-CsA and Cs9 on mitochondria from different brain regions. *Mitochondrion* 11(3): 421–429
  20. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB (2014) Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 71(14): 2577–2604
  21. Halestrap AP (1975) The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* 148(1): 85–96
  22. Hamilton J, Brustovetsky T, Rysted JE, Lin Z, Usachev YM, Brustovetsky N (2018) Deletion of mitochondrial calcium uniporter incompletely inhibits calcium uptake and induction of the permeability transition pore in brain mitochondria. *J Biol Chem* 293(40): 15652–15663
  23. Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
  24. Heinrich R, Rapoport TA (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur J Biochem* 42(1): 89–95
  25. Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* 3: 31
  26. Herculano-Houzel S (2014) The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62(9): 1377–1391
  27. Holmström KM, Pan X, Liu JC, Menazza S, Liu J, Nguyen TT, Pan H, Parks RJ, Anderson S, Noguchi A, Springer D, Murphy E, Finkel T (2015) Assessment of cardiac function in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 85: 178–182
  28. Kacser H, Burns JA (1973) The control of flux. *Symp Soc Exp Biol* 27: 65–104
  29. Kauppinen RA, Nicholls DG (1986) Pyruvate utilization by synaptosomes is independent of calcium. *FEBS Letters* 199(2): 222–226
  30. Korzeniewski B, Rossiter HB (2015) Each-step activation of oxidative phosphorylation is necessary to explain muscle metabolic kinetic responses to exercise and recovery in humans. *J Physiol (Lond)* 593(24): 5255–5268
  31. Kudin AP, Bimpong-Buta NY-B, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279(6): 4127–4135
  32. Kunz M (2020) Dissertation in Arbeit, Universitätsklinik für Neurologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, unveröffentlichte Ergebnisse
  33. Kvamme E, Torgner IA, Roberg B (2001) Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J Neurosci Res* 66(5): 951–958
  34. Kwong JQ, Lu X, Correll RN, Schwanekamp JA, Vagnozzi RJ, Sargent MA, York AJ, Zhang J, Bers DM, Molkentin JD (2015) The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Rep* 12(1): 15–22



35. LaNoue KF, Carson V, Berkich DA, Hutson SM (2007) 6.1 Mitochondrial/Cytosolic Interactions via Metabolite Shuttles and Transporters. In: Lajtha A, Gibson GE, Diemel GA (eds) *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer US, Boston, MA, pp 589–616
36. Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15(3 Pt 1): 1835–1853
37. Li B, Hertz L, Peng L (2012) Aralar mRNA and protein levels in neurons and astrocytes freshly isolated from young and adult mouse brain and in maturing cultured astrocytes. *Neurochem Int* 61(8): 1325–1332
38. Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113): 787–795
39. Liu X, Gong H, Li X, Zhou W (2008) Monitoring calcium concentration in neurons with cameleon. *J Biosci Bioeng* 105(2): 106–109
40. Magi S, Lariccia V, Castaldo P, Arcangeli S, Nasti AA, Giordano A, Amoroso S (2012) Physical and functional interaction of NCX1 and EAAC1 transporters leading to glutamate-enhanced ATP production in brain mitochondria. *PLoS ONE* 7(3): e34015
41. McCormack JG, Denton RM (1990) The role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and matrix Ca<sup>2+</sup> in signal transduction in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1018(2-3): 287–291
42. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70(2): 391–425
43. McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85(15): 3347–3358
44. Monné M, Vozza A, Lasorsa FM, Porcelli V, Palmieri F (2019) Mitochondrial Carriers for Aspartate, Glutamate and Other Amino Acids: A Review. *Int J Mol Sci* 20(18)
45. Mulisch M (ed) (2015) *Mikroskopische Technik*, 19th edn. Springer
46. Muth K (2012) *Functional Properties of Neuronal and Astrocytic Mitochondria*. Masterarbeit, Neurobiochemisches Labor der Universitätsklinik für Neurologie der medizinischen Fakultät der Otto-von Guericke-Universität Magdeburg.
47. Nichols M, Elustondo PA, Warford J, Thirumaran A, Pavlov EV, Robertson GS (2017) Global ablation of the mitochondrial calcium uniporter increases glycolysis in cortical neurons subjected to energetic stressors. *J Cereb Blood Flow Metab* 37(8): 3027–3041
48. Palmieri F (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25). Physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447(5): 689–709
49. Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T (2013) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol* 15(12): 1464–1472
50. Panov AV, Kubalik N, Zinchenko N, Ridings DM, Radoff DA, Hemendinger R, Brooks BR, Bonkovsky HL (2011) Metabolic and functional differences between brain and spinal cord mitochondria underlie different predisposition to pathology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(4): 54
51. PAPA S, PARADIES G (1974) On the Mechanism of Translocation of Pyruvate and Other Monocarboxylic Acids in Rat-Liver Mitochondria. *Eur J Biochem* 49(1): 265–274

52. PARADIES G (1984) Interaction of  $\alpha$ -cyano[14C]cinnamate with the mitochondrial pyruvate translocator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 766(2): 446–450
53. Park Y, Bowles DK, Kehrer JP (1990) Protection against hypoxic injury in isolated-perfused rat heart by ruthenium red. *J Pharmacol Exp Ther* 253(2): 628–635
54. Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4. ed. Acad. Press, San Diego Calif. u.a.
55. Popinigis J, Antosiewicz J, Crimi M, Lenaz G, Wakabayashi T (1991) Human skeletal muscle: participation of different metabolic activities in oxidation of L-lactate. *Acta Biochim Pol* 38(1): 169–175
56. Ralphe JC, Segar JL, Schutte BC, Scholz TD (2004) Localization and function of the brain excitatory amino acid transporter type 1 in cardiac mitochondria. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37(1): 33–41
57. Ramos M, del Arco A, Pardo B, Martínez-Serrano A, Martínez-Morales JR, Kobayashi K, Yasuda T, Bogóñez E, Bovolenta P, Saheki T, Satrústegui J (2003) Developmental changes in the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated mitochondrial aspartate–glutamate carrier aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord. *Developmental Brain Research* 143(1): 33–46
58. Rasmussen TP, Wu Y, Joiner M-IA, Koval OM, Wilson NR, Luczak ED, Wang Q, Chen B, Gao Z, Zhu Z, Wagner BA, Soto J, McCormick ML, Kutschke W, Weiss RM, Yu L, Boudreau RL, Abel ED, Zhan F, Spitz DR, Buettner GR, Song L-S, Zingman LV, Anderson ME (2015) Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(29): 9129–9134
59. Rüegg JC (1987) Calcium-Regulation der Muskelkontraktion. Die molekularen Regulationsmechanismen der Kontraktilität (Calcium regulation of muscle contraction: the molecular regulation mechanisms of contractility). *Naturwissenschaften* 74(12): 579–584
60. Salkowski E (1897) Zur Kenntniss des Oxydationsferments der Gewebe. *Archiv f. pathol. Anat.* 147(1): 1–23
61. San Martín A, Ceballo S, Baeza-Lehnert F, Lerchundi R, Valdebenito R, Contreras-Baeza Y, Alegría K, Barros LF (2014) Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS ONE* 9(1): e85780
62. Satrústegui J, Pardo B, del Arco A (2007) Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 87(1): 29–67
63. Schöpf B, Schäfer G, Weber A, Talasz H, Eder IE, Klocker H, Gnaiger E (2016) Oxidative phosphorylation and mitochondrial function differ between human prostate tissue and cultured cells. *FEBS J* 283(11): 2181–2196
64. Sharma N, Okere IC, Brunengraber DZ, McElfresh TA, King KL, Sterk JP, Huang H, Chandler MP, Stanley WC (2005) Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and citric acid cycle intermediates during high cardiac power generation. *J Physiol (Lond)* 562(Pt 2): 593–603
65. Srere PA (1969) [1] Citrate synthase. In: *Citric Acid Cycle*, vol 13. Elsevier, pp 3–11
66. Starkov AA, Beal FM (2008) Portal to Alzheimer's disease. *Nat Med* 14(10): 1020–1021
67. Szibor M, Gizatullina Z (2019) Mitochondrial pyruvate supply is adjusted by cytosolic but not matrix calcium. (submitted)
68. Wang P, Fernandez-Sanz C, Wang W, Sheu S-S (2018) Why don't mice lacking the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter experience an energy crisis? *J Physiol (Lond)*

- 
69. Wang X, Levi AJ, Halestrap AP (1996) Substrate and inhibitor specificities of the monocarboxylate transporters of single rat heart cells. *Am J Physiol* 270(2 Pt 2): H476-84
  70. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the biconchonic acid protein assay. Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 175(1): 231–237

## 7 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Klinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg angefertigt. Herrn Prof. Dr. H.-J. Heinze sei für diese Möglichkeit herzlich gedankt.

Herrn Prof. Dr. Vielhaber, dem Leiter des Neurochemischen Labors der Klinik für Neurologie, danke ich für die Bereitstellung der Ressourcen und sein Interesse an der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Gellerich möchte ich für die Überlassung des Themas, für die immer hilfreichen, interessanten und nicht nur mitochondrienbezogenen Diskussionen und vor allem für die hervorragende Betreuung herzlich danken.

Ganz lieben Dank an Frau Dr. Debska-Vielhaber, deren inhaltliche und insbesondere moralische Unterstützung einen großen Beitrag zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit geleistet hat.

Großer Dank an Frau Dr. Gizatullina, Frau Kaiser und Frau Witzke für Ihre Hilfe bei den Experimenten.

Frau Lux bin ich für die großartige Unterstützung bei der statistischen Auswertung der unendlich langen Excel-Tabellen zutiefst dankbar.

Dr. Nullmeier danke ich für die Anleitung und Hilfe bei der Präparation der untersuchten ZNS-Regionen.

Außerdem möchte ich mich bei Michael Arndt für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens sowie für die lustigen Dropbox-Dialoge bedanken.

Weiterhin möchte ich Matthias Kunz für seine große Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor und für die hin und wieder lustige Atmosphäre danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meinen Eltern und meiner Schwester, die mich zu jeder Zeit und in jeglicher Art und Weise unterstützt haben. Ich danke meinen Eltern, für alle Chancen und Privilegien, die ich haben durfte und möchte ihnen meine Promotionsarbeit widmen.

## 8 Ehrenerklärung

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

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Substratverwertung in Mitochondrien verschiedener ZNS-Regionen. Untersuchungen an normalen Ratten und Mäusen.

in der Universitätsklinik für Neurologie

mit Unterstützung durch Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Frank N. Gellerich

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

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

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

Magdeburg, den 10.02.2020

Unterschrift

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Niki Karavasili
Geburtsdatum	09.04.1994
Geburtsort	Cholargos, Griechenland
Staatsangehörigkeit	griechisch

### Schulbildung

2000 – 2006	Grundschule Ellinogermaniki Agogi in Athen, Griechenland
2006 – 2012	Deutsche Schule Athen, Griechenland
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Abiturnote 1,5

### Studium

2012 – 2018	Medizinstudium an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Gesamtnote 2,3
-------------	--

### Famulaturen

08 – 09/16	Herz- und Thoraxchirurgie, Krankenhaus „Hippokration“, Athen, Griechenland
02 – 03/16	Plastische Chirurgie, Martin-Luther-Krankenhaus, Berlin
08 – 09/15	Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus „Erythros Stavros“, Athen, Griechenland
02 – 03/15	Hausarztpraxis Dr. Angelika Brandt, Magdeburg

### Praktisches Jahr

11/17 – 03/18	Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinik Magdeburg
03 – 07/18	Anästhesie und Notfallmedizin, Universitätsklinik Magdeburg
07 – 11/18	Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus „Attikon“, Athen, Griechenland

### Berufliche Laufbahn

05/19 – heute	Assistenzärztin in der Orthopädie, Krankenhaus St. Marienstift, Magdeburg
03/16 – 05/19	OP-Assistentin, Krankenhaus St. Marienstift, Magdeburg

Magdeburg, den 10.02.2020

Unterschrift

## 10 Anlagen

### 10.1 Sachkundenachweis für das Töten von Versuchstieren



**MEDIZINISCHE  
FAKULTÄT**

Der Dekan

Prof. Dr. med.  
Hermann-Josef Rothkötter

## Teilnahmebestätigung

Frau

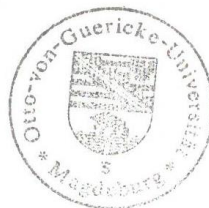
*Niki Karavasili*

hat erfolgreich am 27. Kursus (Wintersemester 2015 / 2016)

**„Einführung in tierexperimentelle Methoden  
für Doktoranden, wissenschaftliches und  
nichtwissenschaftliches Personal der  
Hochschule“**

teilgenommen.

Magdeburg, 18. Januar 2016



Dr. R. Matthias  
Tierschutzbeauftragter