Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Michael Georgieff
Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Leiter: Prof. Dr. Dr. med. h.c. Peter Radermacher

Charakterisierung der mitochondrialen Funktion in kleinen Leberbiopsien der Maus.

Evaluation der Technik und Untersuchung der Effekte unterschiedlicher Körpertemperaturen.

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Susanne Linda Majer

aus Ulm

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Enrico Calzia

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 14.11.2013

Meinen Eltern und meinen Geschwistern

Inhaltsverzeichnis:

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abkürzungsverzeichnis ..... **III**

1 Einleitung **1**

1.1. Mitochondrien 1

1.2. Gewinnung mitochondrialer Proben 3

1.3. Erforschung der mitochondrialen Funktion mit dem OXYGRAPH-2k 4

1.4. Temperaturschwankungen bei Experimenten an der Maus 5

1.5. Vorgehen bei der Untersuchung der mitochondrialen Funktion 6

1.6. Fragestellung/Ziele 8

2 Material und Methoden **9**

2.1. Tiermodell Maus 9

2.2. Narkoseeinleitung und Operation 9

2.3. Lösungsmedien 11

2.4. Messung der mitochondrialen Atmung mit dem OXYGRAPH-2k 13

2.5. Präparation der Gewebeproben 17

2.6. Messung der mitochondrialen Atmung 18

2.7. Datenverarbeitung und Statistik 32

3 Ergebnisse **34**

3.1. Permeabilitätsmessungen 34

3.2. Untersuchung der Temperatureffekte 36

3.3.Messungen im OXYGRAPH-2k bei 30 °C 54

4 Diskussion **61**

4.1. Permeabilitätsmessungen 61

4.2. Temperatureffekte 63

4.3. Messung der mitochondrialen Atmung bei unterschiedlichen Temperaturen im Oxygraphen 79

4.4. Grenzen der Methode 83

4.5. Schlussfolgerung 86

5 Zusammenfassung 90

6 Literaturverzeichnis 92

7 Lebenslauf 105

8 Danksagung 107

Abkürzungsverzeichnis:

&	Und
α	Alpha
AA	Antimycin A
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance
Asc	Ascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
° C	Grad Celsius
CI	Komplex I
CII	Komplex II
CIII	Komplex III
CIV	Komplex IV
c	Cytochrom c
ca.	circa
Ca^{2+}	Kalziumionen
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom c Oxidase
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cyt	Cytochrom c
CI+CII Ratio	Complex I und Complex II Ratio
D	ADP
Dig	Digitonin
Dr.	Doktor
et al.	et alii, et aliae, et alia (und andere)
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ETF	Elektronen-transferierendes Flavoprotein

ETS	Electron Transport System
$FADH_2$	Flavinadenindinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazon
F_c	Kalibrierungsfaktor
FiO_2	Fraction of Inspired Oxygen
F_M	Löslichkeitsfaktor von Sauerstoff
F_O-Untereinheit	F-Typ-ATPase
g	Gramm
GDH	Glutamatdehydrogenase
g/l	Gramm pro Liter
Glu	Glutamat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde (hora)
H_2O	Wasser (Dihydrogenmonoxid)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Hrsg	Herausgeber
HPO_4	Hydrogenphosphat
HZV	Herzzeitvolumen
IDH	Isocitratdehydrogenase
Inc.	Incorporated
Jr.	Junior
K^+	Kaliumion
KCN	Kaliumcyanid
KH_2P0_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K-Lactobionat	Kalium-Lactobionat
kPa	Kilopascal
l	Liter
L/E	Leak Flux Control Ratio
M	Mol
Mal	Malat
MDH	Malatdehydrogenase
mg	Milligramm

Mg^{2+}	Magnesiumion
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
MiR05	Mitochondrial Respiration Medium
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Millimeter Hydrargyrum)
µg	Mikrogramm
µg/g	Mikrogramm pro Gramm
µM	Mikromol
µM/kPa	Mikromol pro Kilopascal
µl	Mikroliter
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NH_4	Ammoniumion
nmol/ml	Nanomol pro Milliliter
NO	Stickstoffmonoxid
O	Oligomycin
O_2	Sauerstoff
OGDH	Oxoglutaratdehydrogenase
OH^-	Hydroxylgruppe
Olg	Oligomycin
OP	Operation
P	anorganisches Phosphat
PEEK	Polyetheretherketon
PEEP	Positive End Expiratory Pressure
pH	pouvoir hydrogène
Phd1	Prolylhydroxylase 1
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
pK-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante K
pmol	Picomol
pmol/(s*cm3)	Picomol pro Sekunde und Kubik-

	zentimeter
pmol/(s*mg)	Picomol pro Sekunde und Milligramm
POS	polarographischer Sauerstoffsensor
R	Sauerstoffsignal
R0	Sauerstoffsignal zum Messzeitpunkt 0 (Sauerstoffkonzentration von 0 nmol/ml)
R1	Sauerstoffsignal zum Messzeitpunkt 1 (Sensorsignal zum Zeitpunkt der Äquilibrierung des Messmediums an den Sauerstoffpatialdruck der Umgebung)
RCR	Respiratory Control Ratio
Reox	Reoxygenierung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rot	Rotenon
RS	Recommended Standard
Rt	Sauerstoffsignal zum beliebigen Mess-zeitpunkt t
S	Seite
s	Sekunde
SDH	Succinatdehydrogenase
S_{O2}	Sauerstofflöslichkeit
sog.	sogenannt
St.	Saint
Suc	Succinat
t	Time (Zeit)
Tab.	Tabelle
TMPD	Tetramethyl-p-phenylendiamin
TOM	Translocases in the outer membrane
u	Uncoupling
UCP1	uncoupling protein 1
UCP2	uncoupling protein 2
UCP3	uncoupling protein 3
UCR	Uncoupling Control Ratio
USA	United States of America

U-Test	Mann-Whitney-Rangsummentest
Q	Ubiquinon
x	x-Achsenwert
y	y-Achsenwert
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1. Mitochondrien

Mitochondrien sind erst seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt. Erste elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Organellen beschrieben sie als Körnchen, die in der Zelle Fäden bilden [Bernard et al. 2007]. Hier interagieren sie mit Kern, endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Zytoskelett. Je nach dem, in welchem Aktivierungszustand sich die Mitochondrien gerade befinden, wechseln sie bei ATP-Bedarf (ATP: Adenosintriphosphat) vom orthodoxen zum kondensierten Zustand [Bernard et al. 2007]. Den ersten Anhalt für auf mitochondrialen Defekten beruhende Krankheiten erbrachten Ernster, Ikkos und Luft im Jahre 1959 bei der Untersuchung isolierter Mitochondrien aus einem menschlichen Skelettmuskel. Dieser wies einen Hypermetabolismus auf, der sich nicht auf eine erhöhte Schilddrüsenfunktion zurückführen ließ [Lee 1995]. Die erste erkannte Mitochondrienkrankheit war die Leber´sche hereditäre Optikusneuropathie, eine im mittleren Lebensalter auftretenden Erblindung. Hier liegt eine Mutation der NADH-Q-Oxidoreduktase (NADH: Nikotinamidadenindinukleotid; Q: Ubiquinon) des Komplexes I (NADH-Dehydrogenase) vor [Berg et al. 2003]. Eine der wichtigsten mitochondrialen Fuktionen ist die ATP-Produktion, besonders im Muskel [Bernard et al. 2007; Tonkonogi et al. 1999]. Dementsprechend gibt es viele Untersuchungen an menschlichen Muskelbiopsien über die Bedeutung der Mitochondrien für den Trainingszustand der Muskulatur [Rasmussen und Rasmussen 2000]. Hierbei scheint die intrazelluläre Homöostase von zentraler Bedeutung für die optimale Funktion der Organellen zu sein. Diese kann gerade durch schwere Muskelarbeit und dem damit verbundenem mechanischen Stress sowie durch das erhöhte Risiko der Bildung freier Radikaler aufgrund der vermehrten O_2-Aufnahme (O_2: Sauerstoff) gestört sein [Rasmussen et al. 2001 a; Tonkonogi et al. 1999]. Auch der Abfall des pH-Wertes (pH: pouvoir hydrogène; „Wasserstoffkraft“) aufgrund der Laktat-Bildung und der Protonenanhäufung kann die Mitochondrien beeinträchtigen. Ebenso kann das Ansteigen des Phosphatspiegels nach der Spaltung des Kreatinphosphats die Permeabilität der mitochondriellen Membran in Mitleidenschaft ziehen, und die Erhöhung des Kalziumgehalts kann das Organell zusätzlich schädigen. Bei leichter Arbeit treten diese Phänomene noch nicht auf, und die mitochondriale Funktion bleibt unbeeinflusst von Störfaktoren [Rasmussen et al. 2001 a; Tonkonogi et al. 1999]. Auch spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle im Rahmen des Sepsis-Geschehens [Levy und Deutschman 2007; Piel et al. 2007, 2008] und bei Ischämie-

Reperfusionsschäden, z.B. (zum Beispiel) nach einem Herzinfarkt, da es hierbei zu einem Verlust des Cytochrom c aus den Mitochondrien kommt, was einen Untergang der Zellen zur Folge hat [Kuznetsov et al. 2004]. Hierbei hat die mitochondriale Funktion eine direkte Auswirkung auf das Überleben nach dem Ereignis. Aber die Zellorganellen tragen auch zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur bei. Hierfür wird bei kleinen Säugetieren eine durch das sympathische Nervensystem geregelte Entkopplung der Mitochondrien des braunen Fettgewebes hervorgerufen. Diese sog. (sogenannte) „adaptive Thermogenese" kann bei Kälteexposition auch im menschlichen Skelettmuskel stattfinden [Wijers et al. 2008]. Daneben erfüllen sie im Organismus noch eine Vielfalt an anderen Aufgaben und sind essentiell für sein Bestehen. Sie nehmen in diversen Lebensprozessen eine Schlüsselrolle ein. So löst eine Freisetzung von Cytochrom c und des „apoptosis-inducing-factor" (Apoptose hervorrufender Faktor) aus dem Mitochondrium ins Zytosol durch Aktivierung einer Reihe von Caspasen den programmierten Zelltod oder eine Nekrose der Zelle aufgrund mangelnder ATP-Produktion aus [Borutaite et al. 2001; Kuznetsov et al. 2004; Von Ahsen et al. 2000]. Auch schreibt man ihnen eine große Bedeutung im Rahmen von Alterungsprozessen zu, denn sie sind trotz ihrer diversen Schutzmechanismen Ursache großer Mengen an Sauerstoffradikalen (vor allem Superoxid), die im Laufe des Lebens akkumulieren und zu oxidativen Schäden der Mitochondrien sowie ihrer DNA selbst führen [Gnaiger et al. 2005; Hütter et al. 2004, 2007]. Damit verstärken sie noch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und können so letztlich die Zellalterung verursachen [Gnaiger et al. 2005; Hütter et al. 2004, 2007]. Entsprechend der Vielzahl an Aufgaben der Mitochondrien haben Störungen ihrer Funktion ein buntes Bild an Pathologien zur Folge. Diese Krankheitsbilder werden entweder durch Mutationen im mitochondrialen Genom selbst oder im Erbmaterial der Zelle hervorgerufen, die veränderte Enzyme und Proteine der Komplexe mit Einschränkungen in der Funktion zur Folge haben. Dabei können die Pathologien Störungen in den einzelnen Komplexen zugeordnet werden. So ist z.B. der Morbus Parkinson assoziiert mit Mängeln in den Komplexen I und III, während die sideroblastische Anämie mit Defekten des Komplexes IV in Zusammenhang steht [Rossignol et al. 2003]. Auch die Entwicklung einer Kardiomyopathie kann durch Schäden des Komplexes III verursacht werden [Rossignol et al. 2003]. Neben diesen Beispielen gibt es noch eine Vielzahl an anderen mitochondriell bedingten Erkrankungen, die vor allem die Muskulatur [Chomyn et al. 1991; Rossignol et al. 2003] betreffen, da diese bei ihrer energetisch sehr aufwendigen Funktion in besonderem Maße auf die schnelle und kontinuierliche Lieferung von ATP angewiesen sind [Rossignol

et al. 2003]. Aber auch andere Organe, wie das Herz oder das Nervensystem, reagieren äußerst sensibel auf eine Einschränkung des ATP-Angebots [Berg et al. 2003]. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei der Anteil der mutierten mitochondriellen DNA an der gesamten DNA dieses Zellorganells, da die Proteine der intakten Mitochondrien bis zu einem hohen Schwellenwert hin die Aufgaben ihrer funktionslosen Korrelate kompensieren können [Kunz et al. 2000]. Damit lässt sich auch erklären, warum die Ausbildung des Phänotyps ein und desselben Defektes von Patient zu Patient, selbst innerhalb derselben Familie, sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann [Berg et al. 2003; Kunz et al. 2000]. Aufgrund der neueren Forschungsergebnisse ist zu erwarten, dass die Bedeutung der Mitochondrien für den Organismus noch sehr viel weitreichender ist, als man es bisher angenommen hatte.

1.2. Gewinnung mitochondrialer Proben

Zur Untersuchung der mitochondrialen Funktion ist es notwendig, die Zellorganellen wissenschaftlichen Methoden zugänglich zu machen. Das gestaltet sich insofern als schwierig, als dass diese Organellen sehr klein sind (bei variabler Länge weisen sie eine Dicke von ca. 1 µm auf [Löffler und Petrides, 2003]), was die Gewinnung geeigneter Proben erschwert. In den Anfängen ihrer Erforschung wurden die Mitochondrien mit Hilfe der Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie untersucht, die es zwar ermöglichte, sie in ihrer erhaltenen zellulären und zytoskelettären Umgebung zu erkunden, aber eine Beeinflussbarkeit des extramitochondrialen Milieus ausschloss [Saks et al. 1998]. Deshalb wurde als alternative Technik die Isolierung der Mitochondrien per Homogenisierung großer Gewebemengen und anschließender Separierung der Organellen mittels Zentrifugation entwickelt [Saks et al. 1998]. Aber diese Vorgehensweise beinhaltet gleich mehrere Nachteile: 1. benötigt man eine große Menge an Gewebe; 2. werden durch die Zentrifugation strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Organellen beeinträchtigt; 3. Werden die Interaktionen der Mitochondrien mit dem Zytoskelett und dem Zytoplasma gestört, was besonders die Beurteilung von bereits durch Pathologien vorgeschädigten Gewebes erschwert [Saks et al. 1998] und 4. kommt es zur Selektion bestimmter Mitochondrienpopulationen, da 90 % der Organellen zerstört werden [Saks et al. 1994]. In Anbetracht der vielen Einschränkungen der isolierten Mitochondrien etablierte sich ein neueres Verfahren, bei dem kleinste Gewebeproben mit Saponin oder Digitonin permeabilisiert wurden. Somit bot diese Technik nun die Möglichkeit, die mitochondriale Funktion aller im Gewebe enthaltenen Populationen in situ zu analysieren und das extra-mitochondriale Medium zu kontrollieren [Gnaiger et al.

1998 a; Saks et al. 1998]. Dies erwies sich besonders bei der Untersuchung mitochondrialer Funktionsstörungen in Geweben, von denen nur geringe Mengen zur Verfügung stehen, wie z.B. Biopsien aus dem menschlichen Herzmuskel bei Angiographien, Zellkulturen und Studien an teuren, transgenen Tieren, als vorteilhaft [Saks et al. 1994; Saks et al. 1998]. Allerdings hat der Gebrauch dieser Substanzen auch Nachteile, z.B. kann es bei der nötigen Einwirkzeit zu Schädigungen des Gewebes [Kuznetsov et al. 2002] oder der Mitochondrien selbst [Saks et al. 1994] kommen, besonders wenn Digitonin oder Saponin überdosiert werden [Hoppel und Cooper 1968; Saks et al. 1998]. Um diese Probleme zu umgehen und trotzdem Messungen an Mitochondrien aus permeabilisierten Gewebeproben durchführen zu können, testete die Forschergruppe um Andrey V. Kuznetsov ein neues Verfahren, nämlich die Technik der mechanischen Permeabilisierung, bei der durch vorsichtiges Zerrupfen der Gewebeproben und anschließendes Schwenken des Gewebes in einer Nährlösung die endogenen, zellulären Substrate des Zytoplasmas herausgepült werden, wodurch das Gewebe einer Kontrolle des extramitochondrialen Milieus von Außen zugänglich wird [Kuznetsov et al. 2002]. Sie wendeten dieses Verfahren bereits im Jahre 2002 an Schweinelebern an [Kuznetsov et al. 2002]. Die Vorteile bei diesem Vorgehen sind zum einen der, dass recht kleine Gewebemengen ausreichend sind, was insbesondere bei Studien an Mäuselebern, bei denen aufgrund der geringen Organgröße nur kleine Biopsien gewonnen werden können, von Bedeutung ist, und andererseits der, dass durch die Chemikalien hervorgerufene Artefakte umgangen werden. In Anbetracht all dieser Faktoren entschieden wir uns dafür, bei unseren Experimenten das Gewebe ebenfalls mechanisch zu permeabilisieren. Allerdings wurde diese Technik noch nie an Gewebe aus der Mäuseleber erprobt, deshalb widmet sich der erste Teil dieser Arbeit der Analyse, ob sich die Methodik der mechanischen Permeabilisierung auf die Mäuseleber übertragen lässt und ob eine zusätzliche chemische Permeabiliserung notwendig oder gar schädlich ist.

1.3. Erforschung der mitochondrialen Funktion mit dem OXYGRAPH-2k

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen an Mitochondrien aus Biopsien der Mäuseleber vorgenommen. Die dabei verwendeten Gewebeproben sind sehr klein, ebenso wie die Menge der darin enthaltenen Zellorganellen. Dementsprechend gering fallen auch die zu messenden Veränderungen der O_2-Konzentration aus. Lange Zeit war es extrem aufwendig, den O_2-Bedarf selbst großer Gewebemengen zu erheben [Haller et al. 1994]. Den Grundstein zur polarographischen Bestimmung der O_2-Konzentration legte 1954 Leland Clark mit der Entwicklung seiner Clark-Elektrode, mit deren Hilfe es erstmals

möglich war, minimale Veränderungen des O_2-Partialdrucks in Flüssigkeiten, z.B. Blut, messen zu können [Severinghaus 2002]. Vor der Entdeckung dieser Technik musste zur Erhebung des O_2-Bdarfs auf chemische, manometrische oder volumetrische Verfahren zurückgegriffen werden. Teilweise wurden die Geräte von Hand hergestellt, was die Vergleichbarkeit der gewonnen Daten stark einschränkte [Haller et al. 1994]. Besonders die unter physiologischen Bedingungen herrschenden niedrigen Sauerstoffpartialdrücke nachzuempfinden, stellte eine technische Herausforderung dar. Außerdem war es schwierig, die Stabilität des Messsignals über alle O_2-Konzentrationen hinweg sowie die benötigte hohe zeitliche Auflösung zu gewährleisten [Gnaiger et al. 1995]. Viele dieser Schwierigkeiten löst der OXYGRAPH-2k, dessen polarographischer Sauerstoffsensor (POS) als Kernstück eine Clark-Elektrode enthält, indem er bei einer hohen zeitlichen Auflösung geringste Veränderungen der O_2-Konzentration bei sehr niedrigen O_2-Partialdrücken bestimmen kann. Damit ermöglicht der OXYGRAPH-2k die Erforschung diverser von den Mitochondrien ausgehenden Krankheiten. Auch die Verarbeitung von Zellkulturen mit geringer Zellzahl oder kleinster Gewebemengen wie menschliche Biopsate, die prozessbedingt klein sind, ist dadurch realisierbar [Garedew et al. 2005; Gnaiger 2003; Gnaiger et al. 1998 a]. So kommt der OXYGRAPH-2k mit einer Menge von weniger als 0,05 mg (Milligramm) mitochondrialen Proteins aus. Damit braucht er nur ein Zehntel der Menge an Gewebe, die seine Vorgänger als Minimum voraussetzten [Gnaiger 2008 e]. Ebenso erlaubt er Messungen bei niedrigen O_2-Partialdrücken, wodurch sich die Testbedingungen den physiologischen Verhältnissen besser annähern lassen [Garedew et al. 2005; Gnaiger 2003; Gnaiger et al. 1998 a]. Mit diesen Eigenschaften bildet der OXYGRAPH-2k eine gute Grundlage zur Erforschung der mitochondrialen Funktion.

1.4. Temperaturschwankungen bei Experimenten an der Maus

In den Anfängen der Verwendung der Maus als Versuchstier zog man sie nur als Model für genetische Erkrankungen heran, später auch für die Erforschung von Tumorerkrankungen und ihrer Therapie. Heute dient sie als Model für annähernd jede mögliche Krankheitsentität, z.B. Haarausfall und psychiatrische Abweichungen [Roberts und Threadgill 2005]. Ein Unterschied zwischen Mensch und Maus ist jedoch der, dass die Maus aufgrund ihrer geringeren Größe im Vergleich zu ihrem Volumen eine größere Oberfläche besitzt. Daher muss sie zur Aufrechterhaltung ihrer konstanten Körpertemperatur eine höhere metabolische Rate aufweisen als zum Beispiel ein Mensch. Dabei ist die metabolische Rate sowohl von der Größe als auch der Temperatur abhängig [Hoyt et al. 2007]. Dementspre-

chend schnell entwickelt eine narkotisierte Maus aufgrund ihres ungünstigen Masse-Oberflächen-Verhältnisses bei einer hohen metabolischen Rate eine Hypothermie. Dieses führt beispielsweise zu Bradykardie und anderen Stoffwechselveränderungen [Hoyt et al. 2007]. Das könnte bei allen Untersuchungen an dieser Spezies, z.B. bei der Analyse der protektiven Wirkung einzelner Substanzen wie Schwefelwasserstoff auf den Organismus im Rahmen eines Sepsisgeschehens, zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen [Su et al. 2005; Remick und Xioa 2006]. Deshalb sollte bei Experimenten an dieser Tierart darauf geachtet werden, sie kontinuierlich mittels Wärmematten und -lampen auf einem konstanten Temperaturniveau zu halten [Piel et al. 2007]. Nun stellt sich die Frage, wie stark ausgeprägt diese Temperatureffekte tatsächlich sind und ob es wirklich notwendig ist, so große Anstrengungen zur Erhaltung der Körpertemperatur zu unternehmen, oder ob es nicht ausreichend ist, mit weniger intensiven Maßnahmen wie z.B. nur einer Wärmematte dem Abkühlen der Mäusekörper entgegenzuwirken. Zur Untersuchung dieser Frage wurde in dieser Arbeit die Atmung von Mitochondrien aus der Mäuseleber bei Temperaturen von 27 °C (°C: Grad Celsius) und 37 °C verglichen. Im Rahmen von Voruntersuchungen zur Erprobung des Umgangs mit der Methodik unternahmen wir Messungen bei 30 °C im Oxygraphen. Um nun auch Effekte der Messtemperatur auf die Funktion der Organellen zu analysieren, widmet sich der letzte Teil der Frage, inwiefern die in vitro-Temperatur das Ergebnis beeinflusst.

1.5. Vorgehen bei der Untersuchung der mitochondrialen Funktion

In intakten Zellen werden über vier Wege Elektronen in die Atmungskette eingeschleust: Ein Weg stellt die Glycerophosphatdehydrogenase dar, die mit Hilfe des aus der Glykolyse stammenden Dihydroxyacetonphosphats Reduktionsäquivalente in das Mitochondrium transportiert. Die dabei entstehenden $FADH_2$ ($FADH_2$: Flavinadenindinukleotid) übertragen ihre Elektronen auf Ubichinon. Eine weitere Möglichkeit des Elektronenflusses auf Ubiquinon ist das „Elektronen-transferierende Flavoprotein“ (ETF), das seine negativen Ladungen aus der β (Beta)-Oxidation von Fettsäuren erhält. Die dritte Variante ist Komplex I (NADH-Dehydrogenase), der seine Elektronen vom NADH aus dem Zitratzyklus und von der Pyruvatdehydrogenasereaktion bezieht [Gnaiger 2008 a]. Die letzte Bezugsquelle bildet das von der Succinatdehydrogenase (Komplex II) generierte $FADH_2$, das die Elektronen auf den Komplex II weiterleitet, über den sie schließlich auch in die Elektronentransportkette eintreten können [Gnaiger 2008 a]. Von Ubiquinon fließen die negativen Ladungen über die Cytochrome b und c1 des Komplexes III (Ubiquinon:Cytochrom c

Oxidoreduktase) auf Cytochrom c und werden von dort auf das Cytochrom ($a+a_3$) des Komplexes IV (Cytochrom c Oxidase; COX) übergeben [Nelson et al. 2005]. Die COX katalysiert nun die Reaktion von O_2 mit Protonen aus der Matrix zu Wasser, indem es die Elektronen auf O_2 überträgt [Nelson et al. 2005]. Der Fluss von negativen Ladungen entlang den Komplexen auf O_2 ist mit einem hohen Maß an Energiegewinn verbunden. Diese Energie wird dazu genutzt, über der inneren Mitochondrienmembran einen Protonengradienten aufzubauen. Dieser entsteht dadurch, dass Komplex I und III jeweils vier Protonen und Komplex II zwei Protonen von der Matrix in den Membranzwischenraum transportieren [Nelson et al. 2005]. Der Abbau dieses Gradienten erfolgt über die ATP-Synthetase (Komplex V). Sie setzt nun die beim Wechsel der Protonen vom Intermembranraum zur Matrixseite frei werdende Energie in Form von ATP-Produktion um [Nelson et al. 2005]. Dabei bilden die die Elektronen übertragenden Komplexe I-IV das sog. „Electron Transport System" (ETS) [Gnaiger 2008 a], während Komplex V die oxidative Phosphorylierung betreibt [Gnaiger 2008 d]. Einen Überblick über den Elektronenfluss unter physiologischen Verhältnissen gibt Abbildung (Abb.) 1. Ein Parameter der mitochondrialen Funktion ist der O_2-Verbrauch der Mitochondrien durch die Komplexe. Dementsprechend beruht das Prinzip ihrer Untersuchung darauf, die jeweiligen Komplexe zuerst mittels ihrer Substrate zu stimulieren, um sie dann nach der Bestimmung der Atmungsaktivitäten nacheinander zu hemmen. Auf diese Weise ist es möglich, basierend auf dem O_2-Verbrauch durch die einzelnen Komplexe, diese sowohl gemeinsam als auch isoliert voneinander zu analysieren. So lassen sich Defekte der Komplexe und ihr Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien erforschen [Garedew et al. 2005; Groen et al. 1982; Kuznetsov et al. 1997]. Dabei ist die Architektur des Messprotokolls von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft der gewonnen Ergebnisse. In dieser Arbeit wird bei der Untersuchung der Temperatureffekte ein Protokoll angewendet, bei dem die Komplexe I und II mit der gleichzeitigen Gabe der Substrate Malat, Glutamat und Succinat simultan stimuliert werden. Damit bietet es die Möglichkeit, die physiologischen Verhältnisse besser nachzuempfinden, als die Protokolle, die die beiden Komplexe nacheinander stimulieren [Gnaiger 2009, 2008 c; Gnaiger et al. 2005]. Andere wichtige Elemente sind der Cytochrom c-Test zur Überprüfung der Intaktheit der mitochondriellen Membran und die Entkopplung des ETS von der ATP-Produktion mit FCCP (FCCP: Carbonyl-cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon). FCCP schafft einen „Protonen-Kurzschluss", der es ihnen ermöglicht, unabhängig von der ATP-Synthese vom Intermembranraum in die Matrix zu gelangen [Gnaiger 2008 e; Gnaiger et al. 1998 c]. Auf diese Weise ist das ETS nicht von

der Kontrolle durch die ATP-Synthetase limitiert [Gnaiger 2008 e; Hütter et al. 2007]. Da die Ergebnisse sowie ihre Interpretation entscheidend vom verwendeten Protokoll abhängen, wird bei der Diskussion der Temperatureffekte erst auf die Charakterisierung des Protokolls eingegangen, bevor die Temperatureffekte analysiert werden.

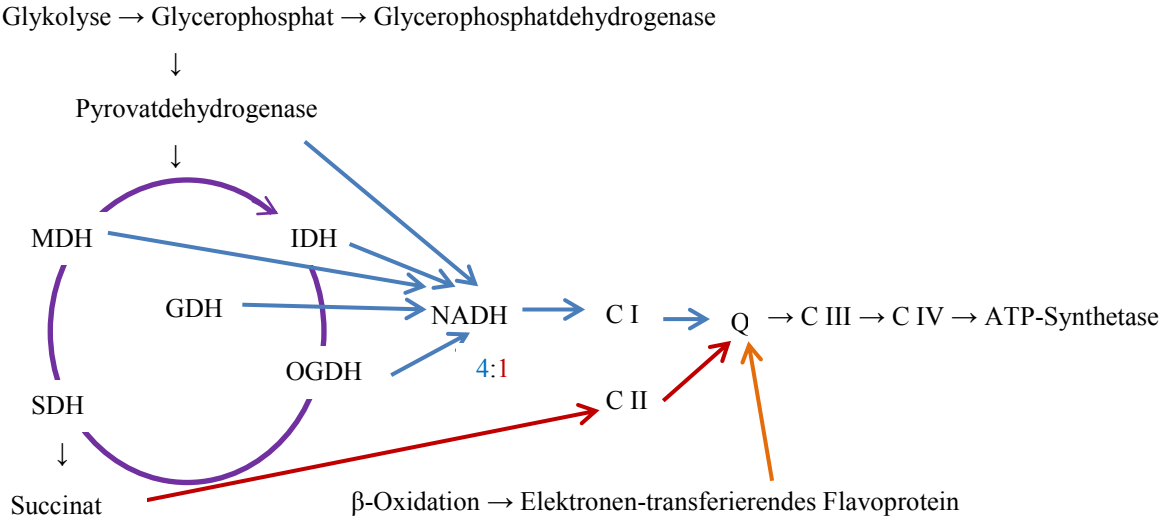

Abb. 1: Schema des Elektronenflusses der Atmungskette (modifiziert nach Gnaiger 2008 a)
ATP: Adenosintriphosphat; β: Beta; CI-IV: Komplex I-IV; GDH: Glutamatdehydrogenase; IDH: Isocitratdehydrogenase; MDH: Malatdehydrogenase; NADH: Nikotinamidadenindinukleotid; OGDH: Oxoglutaratdehydrogenase; SDH: Succinatdehydrogenase; Q: Ubiquinon. Farben: Blau: NADH-liefernde Stoffwechselwege; Lila: Zitratzyklus; Orange: Elektonenfluss aus β-Oxidation; Rot: $FADH_2$ (Flavinadenindinukleotid)-liefernde Stoffwechselwege.

1.6. Fragestellung/Ziele

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die vorliegende Arbeit die Beantwortung folgender Fragestellungen zum Gegenstand hat:

1. Ist die mechanische Permeabilisierung von Leberbiopsien der Maus ausreichend zur Charakterisierung der mitochondrialen Funktion der Maus?
2. Ist eine zusätzliche chemische Permeabilisierung notwendig oder sogar schädlich?
3. Inwieweit beeinflussen Schwankungen der Körpertemperatur die mitochondriale Atmung der Maus nachhaltig?
4. Inwiefern beeinflusst die in vitro-Temperatur das Testergebnis?

2 Material und Methoden

2.1. Tiermodell Maus

Die Versuchsreihe wurde nach Überprüfung der Einhaltung der Tierschutzgesetze des Landes Baden-Württemberg durch den Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm und das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Als Versuchstiere dienten 30 etwa 10-12 Wochen alte männliche und weibliche C57BI/6 Mäuse mit einem Gewicht von 22-27 g (Gramm). Sie wurden für diesen Versuch im Tierforschungszentrum Oberberghof der Universität Ulm gezüchtet. Aufgrund ihrer im Vergleich zum Menschen höheren metabolischen Rate sind sie für das Vorhaben, die Untersuchung von Temperatureffekten auf die mitochondriale Atmung, besonders geeignet [Terpstra 2001].

2.2. Narkoseeinleitung und Operation

Das Versuchsvorhaben bestand aus einem zweizeitigen operativen Vorgehen, alle Maßnahmen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Abb. 2 zeigt eine Maus intraoperativ.

Abb. 2: Situs Mäuse-Operation

Nach dem Wiegen der Versuchstiere spritzte man ihnen zur Narkoseeinleitung 120 µg/g (Mikrogramm pro Gramm; µg: Mikrogramm) Ketamin (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland), 1,25 µg/g Midazolam (Dormicum® Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und 0,25 µg/g Fentanyl (Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) intraperitoneal. Nun wurde rektal die Körperkerntemperatur gemessen. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen unterteilt. Bei der OP (Operation)

27 °C -Gruppe (OP 27 °C) wurden während der Operation keine spezifischen Maßnahmen zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur unternommen, während für Tiere, die für eine Operation bei 37 °C vorgesehen waren (OP 37 °C-Gruppe; OP 37 °C), zusätzlich eine Feedback-Regulation der Wärmematte und -lampe (TKM-0902 temperature control, FMI Föhr Medical Instruments GmbH (Gesellschaft mit beschränkter Haftung) Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland) durchgeführt wurde, um eine kontinuierliche Körpertemperatur von 37-38 °C sicherzustellen. Zu Beginn des ersten Operationsteils wurde eine mediane Laparatomie von etwa 1 cm (Zentimeter) vorgenommen, die anschließend mit einer 4.0 Naht (Jonhnson & Johnson, Neuss, Deutschland) wieder verschlossen wurde. Um den durch den Eingriff entstandenen Flüssigkeitsverlust auszugleichen, wurde den Mäusen nun 1 ml (Milliliter) Ringerlaktat-Lösung (Ringerlösung Fresenius®, Fresenius Kabi, Erlangen, Deutschland) subkutan in den Rücken injiziert. Danach wurden die Tiere zurück in den warmen Käfig gesetzt. In inhalativer Kurznarkose mit Isoflurane (Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) wurden zur Stabilisierung des Flüssigkeitshaushaltes wiederholt 1 ml Ringerlaktat-Lösung gemischt mit 4 µg/g Glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) subkutan in den Rücken verabreicht. Auf diese Weise wurden auch direkt postoperativ und nach 8 Stunden 1 µg/g Buprenorphin (Temgesic®, Boehringer, Mannheim, Deutschland) zur Schmerzstillung appliziert. Die Antibiose mit 30 µg/g Ceftriaxon (Rocephin®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und 30 µg/g Clindamycin (Sobelin®, Pharmacia &Upjohn, Erlangen, Deutschland) wurde ebenfalls in oben beschriebener Kurznarkose direkt nach der OP und nach 8 und 16 Stunden am Bein unter die Haut gespritzt. Im zweiten Versuchsteil 16 Stunden nach der ersten OP wurden die Mäuse initial erneut gewogen, es erfolgte eine weitere Messung ihrer rektalen Körpertemperatur und die Wärmematte und -lampe wurden zur Konstanthaltung der Temperatur (37-38 °C) nochmals nachreguliert. Bei den Tieren der OP 27 °C-Gruppe wurden Temperaturen um 30 °C gemessen. Nun wurde eine Tracheotomie mit anschließender Intubation mit einem selbstgebauten Tubus, an den ein Beatmungsgerät (Eigenbau) angeschlossen wurde, durchgeführt. Dabei wurde die Maschine auf einen FiO_2 (fraction of inspired oxygen) von 0,5 und einen PEEP (Positive End Expiratory Pressure) von 3cm H_2O (H_2O: Wasser (Dihydrogenmonoxid)) eingestellt. Im Anschluss legte man eine Kanüle (B. Braun, Melsungen, Deutschland) in die rechte Vena jugularis externa, an die eine Infusion von 80 µl/g*h (µl: Mikroliter; h: Stunde) Hextend® (Hospira™, Inc. (Incorporated) Lake Forest, Illinois, USA (United States of America)) angeschlossen wurde. Hextend® ist ein Plasmaexpander, der normalem Plasma ähnelt [Gan

et al. 1999]. Parallel bekamen die Tiere eine Dauerinfusion von 30 µg/g*h Ketamin und 0,3 µg/g*h Fentanyl, um eine ausreichende Betäubung zu gewährleisten. Acht Stunden nach Beginn des zweiten Versuchsteils erfolgten eine Blutentnahme aus der Vena cava inferior und eine Thorakotomie, gleichzeitig wurde das Beatmungsgerät abgeschaltet. Dadurch verstarben die Mäuse. Anschließend wurden Leberproben zur Untersuchung der mitochondrialen Atmung entnommen.

2.3. Lösungsmedien

2.3.1. Custodiol

Die Leberproben wurden zwischen Entnahme und Weiterverarbeitung in Custodiol-Lösung (Dr. (Doktor) Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) gelagert. Diese findet Anwendung bei Leber-, Herz, Pankreas-, und Nierentransplantationen [Mangus et al. 2006; Ringe et al. 2005]. Sie wurde in den 70er Jahren von Bretschneider entwickelt und aufgrund ihrer kardiolplegen Eigenschaften in der Herzchirurgie eingesetzt (Inhaltsstoffe siehe Tab. (Tabelle) 1) [Agarwal et al. 2005; Eghtesad et al. 2006; Krohn et al. 1989]. Mannitol dient als Radikalfänger für ROS, während die im Kalziumchlorid enthaltenen Kalziumionen (Ca^{2+}) die Membranen der inkubierten Gewebe stabilisieren. Das Histidin puffert den pH der Lösung und wirkt so als Oxidationsschutz, ferner ist es ein

Tab. 1: Zusammensetzung von 1 Liter Custodiol-Lösung (modifiziert nach Gnaiger et al. 2000 a)
mM: Millimol; µM: Mikromol

Substanz	**Konzentration**
Mannitol	30 mM
Magnesiumchlorid	4.0 mM
Kalziumchlorid	15 µM
Natriumchlorid	15 mM
Kaliumchlorid	9.0 mM
Histidin	198 mM
Tryptophan	2.0 mM
Ketoglutarat	1.0 mM

Chelator für Metallionen [Gnaiger et al. 2000 a] und verstärkt den osmotischen Effekt des Mannitols. Tryptophan stabilisiert Membranen, um sie vor Verletzungen zu schützen und um das Histidin daran zu hindern, in die Zellen zu gelangen. Als Substrat für den mitochondrialen Stoffwechsel dient Ketoglutarat [Erhard et al. 1994; Jain et al. 2006; Kallerhoff et al. 1986].

2.3.2. MiR05

Während der Präparation und der Messung der mitochondrialen Atmung werden die Proben in das speziell für Mitochondrien entwickelte MiR05 (Mitochondrial Respiration Medium; OROBOROS® Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich) gegeben (Bestandteile siehe Tab. 2). EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) ist ein Chelat-Bildner für

Tab. 2: Zusammensetzung von 1 Liter Nährmedium MiR05 (modifiziert nach Renner et al. 2003-2008)
BSA: Bovines Serumalbumin; EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid; g: Gramm; g/l: Gramm pro Liter; H_2O: Wasser; HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure; KH_2P0_4: Kaliumdihydrogenphosphat; K-Lactobionat: Kalium-Lactobionat; M: Mol; $MgCl_2$: Magnesiumchlorid; MiR05: Mitochondrial Respiration Medium; ml: Milliliter; mM: Millimol.
*In K-Lactobionat-Vorratslösung

Substanz	**Konzentration**	**In 1 Liter enthaltene Menge**
EGTA	0,5 mM	0,190 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 mM	0.610 g
K-Lactobionat	60 mM	120 ml von 0.5 M *
Taurin	20 mM	2.502 g
KH_2P0_4	10 mM	1.361 g
HEPES	20 mM	4.77 g
Sucrose	110 mM	37.65 g
BSA, frei von Fettsäuren	1 g/l	1 g

Schwermetalle, der besonders an Ca^{2+} bindet. Magnesiumionen (Mg^{2+}) gegenüber zeigt er eine geringe Affinität. Einige enzymatische Schritte, z.B. die Aktivierung von ATP selbst, benötigen Mg^{2+}. Daher ist es unerlässlich, den Mitochondrien diese in Form von Magnesiumchlorid ($MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$) in physiologischen Konzentrationen von 1-3 mM (Millimol) zuzuführen. Um für die isolierten Mitochondrien die intrazellulären Bedingungen mit einer Kaliumionen (K^+)- Konzentration von >100 mM nachzuempfinden, enthält MiR05 Kalium (K)-Lactobionat. Taurin stabilisiert Membranen und wirkt, wie Sucrose, als Fänger der ROS. KH_2P0_4 (Kaliumdihydrogenphosphat) liefert die zur ATP-Produktion nötigen Phosphationen. HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure) ist ein Puffer mit einem pK-Wert (pK-Wert: negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante K einer Säure oder Base) von annähernd 7. BSA (Bovines Serumalbumin) hat neben der Aufgabe, Membranen zu stabilisieren, ROS zu deaktivieren und Ca^+ zu entziehen, die Funktion, freie Fettsäuren zu binden [Renner et al. 2003-2008].

2.4. Messung der mitochondrialen Atmung mit dem OXYGRAPH-2k

2.4.1. Aufbau des OXYGRAPH-2k

Die mitochondrialen Atmung wurde mit dem OXYGRAPH-2k (OROBOROS® Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich) gemessen. Bei der Untersuchung der Komplexe der Atmungskette müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Erstens muss das Verfahren darauf ausgelegt sein, mit geringen Probenmengen, zum Beispiel aus Muskel- oder Leberbiopsaten, auszukommen und zweitens muss es die Bestimmung der geringen Veränderungen des O_2-Partialdruckes, die durch den O_2-Verbrauch der Mitochondrien entstehen, ermöglichen [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2008 e]. Dafür benötigt man ein hochsensibles Messgerät, das in der Lage ist, in hoher Zeitauflösung minimale Schwankungen der O_2-Konzentration zu registrieren [Garedew et al. 2005]. Der OXYGRAPH-2k wurde zu diesem Zweck entwickelt. Er besteht aus zwei voneinander unabhängigen Kammern mit einem zwischen 1,5 und 8 ml einstellbaren Volumen, die von einem isolierten, temperaturregulierten Kupfergehäuse umgeben sind. Die Temperaturregelung erfolgt mittels Peltier-Element, dessen Sensor die Wärmedifferenz zwischen dem Kupferblock und der Wärmeverteilungsplatte, die den Kupferblock umgibt, messen [Gnaiger 2001-2006; Haller et al. 1994]. Dadurch gelingt es, bei Messungen zwischen 2-50 °C eine konstante Temperatur mit einer Abweichung von höchstens 0,05 °C über den ganzen Versuch hinweg sicherzustellen [Gnaiger 2001; Gnaiger et al. 1998 a; Haller et al. 1994]. Die zylindrischen Kammern selbst sind mit Glas ausgekleidet und mit einem von einer Titaniumplatte verstärkten Stopfen verschlossen. Der Stöpsel wird von einem Kanal für Hamilton-Injektionsspritzen zur Gabe von Substraten, ebenfalls aus Titanium, durchzogen. Um das geschlossene System vor einem O_2-Austausch mit der Umgebung zu schützen, werden die Stopfen durch einen Viton O-Ring abgedichtet [Gnaiger und Gradl 2004-2006]. Zur Gewährleistung einer homogenen Verteilung des im Inkubationsmedium gelösten O_2, vor allem um den Sensor, befindet sich am Boden jeder Kammer ein mit PEEK (Polyetheretherketon) überzogener Magnetrührstab, dessen Geschwindigkeit auf 100-900 Umdrehungen pro Minute eingestellt werden kann [Gnaiger und Gradl 2004-2006]. Die Messeinheit selbst bildet ein polarographischer Sauerstoffsensor (POS) mit einer Clark-Elektrode, der in einem Winkel von etwa 45° in die Kammer eingelassen ist. Ein Gummiring zwischen Sensor und Glaskammer verhindert an dieser Stelle ein O_2-Leck. Durch das gewinkelte Einbringen werden Störungen des Sensors durch die Rührstäbe vermieden [Gnaiger et al. 1995; Gnaiger 2001-2006; Haller et al. 1994]. Bei seinen Vorgängern stellte sich unter anderem das Problem des O_2-Austauschs mit der Umgebung [Rasmussen 1979], deshalb wurde der OXY-

GRAPH-2k so konstruiert, den O_2-Verlust durch das Gerät selbst möglichst gering zu halten: Das Glas beugt einer Diffusion des Gases aus der Kammer vor. Auch an den Titanium-Stopfen mit den Viton O-Ringen und an der mittels Gummiring abgedichteten Schnittstelle zwischen Sensor und Kammern kann kein O_2 entweichen. Durch die PEEK-Rührstäben wird die bei sinkenden O_2-Partialdrücken beobachtete Rückdiffusion des an der Rühreroberfläche gebundenen O_2 gering gehalten [Gnaiger et al. 1995; Gnaiger 2001-2006; Haller et al. 1994]. Lediglich die Diffusion von O_2 aus der Elektrolytlösung der Clark-Elektrode des POS in die Suspension kann nicht ganz verhindert werden [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2001; Gnaiger 2001-2006]. Um ein Optimum an Genauigkeit und ein Minimum an Artefakten durch Adhäsion der Substrate an die Materialoberflächen und O_2-Diffusion zu erreichen, sollte als Volumen der Kammern 1,5-2 ml gewählt werden [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2001-2006]. So ist es möglich, Messungen an isolierten Mitochondrien und sehr kleinen Gewebemengen (z.B. Biopsaten), vorzunehmen [Garedew et al. 2005; Haller et al. 1994]. Damit erfüllt das Gerät alle Anforderungen für Messungen an permeabilisierten Lebermitochondrien der Maus.

2.4.2. Aufbau der Clark-Elektrode

Die Clark-Elektrode des POS ermöglicht es, innerhalb kürzester Zeit feine Veränderungen der O_2-Konzentration im Medium zu bestimmen. Sie besteht aus einer Gold-Kathode und einer Silber/Silberchlorid-Anode, die über eine Kaliumchlorid-Lösung voneinander getrennt sind. Das Ganze ist zur Abgrenzung der Elektrode vom Medium von einer O_2-durchlässigen Membran aus Teflon umgeben [Gnaiger 2008 e]. Dank des großen Durchmessers der Kathode von 2 mm (Millimeter) erreicht der POS in einem Bereich von 0-100 kPa (kPa: Kilopascal) eine hohe Sensitivität und ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2001-2006]. An die Konstruktion wird ein Strom mit einer Spannung von 0,6-0,8 Volt angelegt [Gnaiger 2008 e]. Bei der Messung des Partialdruckes durchwandert ungelöster O_2 aus der Suspension die Membran und wird an der Kathode durch die vorhandenen Elektronen mit Wasser zu Hydroxid-Ionen reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert, wodurch ein zum O_2-Partialdruck des Mediums proportionaler Strom entsteht [Gnaiger 2008 e]. Unter Kenntnis des von Salzkonzentration und Temperatur abhängigen O_2-Löslichkeitsfaktors F_M (MiR05: im Vergleich zu Wasser bei 30 und 37 °C 0,92) wird der Gasdruck in die O_2-Konzentration umgewandelt [Gnaiger 2008 e].

2.4.3. DatLab 4

Um bei der Untersuchung von Mitochondrien angemessen auf schnelle Änderungen der Atmungsaktivität reagieren zu können, ist es unerlässlich, dass sie in Echtzeit angezeigt werden. Diese Aufgabe übernimmt das hierfür entwickelte digitale Verarbeitungsprogramm DatLab4 (OROBOROS® Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich) [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2001; Haller et al. 1994]. Das vom POS generierte Signal jeder Kammer wird von einem Analog-Digital-Wandler über einen RS-232-Port (RS: Recommended Standard) im Abstand von einer Sekunde (s) (minimal 200 Millisekunden) an DatLab4 gesendet [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2001; Haller et al. 1994]. Der Sensor misst die O_2-Konzentration in Form eines elektrischen Flusses in Ampere, der in Volt umgewandelt, verstärkt und vom Programm als Rohsignal Rt zu jeder beliebigen Zeit t aufgezeichnet wird [Gnaiger 2005-2006]. Das Programm rechnet diese Voltwerte in O_2-Konzentrationen um [Gnaiger 2005-2006] und stellt mittels Druckübersetzers für automatische O_2-Kalibrierung unter Berücksichtigung der Temperatur O_2-Konzentration und -Fluss für jede Kammer unabhängig graphisch dar [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2001; Haller et al. 1994]. Dabei führt DatLab4 über den gesamten Zeitraum hinweg eine kontinuierliche O_2-Hintergrundfluss-Korrektur durch, das heißt, Verfälschungen durch Absorption von O_2 durch den Sensor selbst und die Rückdiffusion des an die Oberflächen der Materialien gebundenen O_2 [Gnaiger et al. 1998 a; Gnaiger 2001; Haller et al. 1994], werden herausgerechnet. So wird auf dem Bildschirm nur die tatsächliche Atmung der Mitochondrien angezeigt [Gnaiger et al. 1998 a].

2.4.4. Vorbereitung des OXYGRAPH-2k

Vor der Messung wurden die Kammern mit 2,2 ml MiR05 gefüllt und in DatLab 4 die Temperatur auf 37 °C eingestellt. Nun wurde das Medium über 30-60 Minuten hinweg bei geöffneten Stopfen mit einer Geschwindigkeit von 750 Umdrehungen/Minute durchmischt. Dieses diente dem Angleich des O_2-Partialdruckes der Flüssigkeit an den O_2-Partialdruck der Umgebung [Gnaiger 2004-2006 b]. Nach der Äquilibrierung wurde eine Kalibrierung durchgeführt, indem im Programm ein Intervall mit konstanter O_2-Konzentration mit „R1“ markiert und im Menü als Bezugswert angegeben wurde [Gnaiger 2004-2006 b].

2.4.5. Bestimmung der Sauerstoffkonzentration und -rückdiffusion

Bei der Untersuchung der mitochondrialen Funktion mit dem OXYGRAPH-2k wird der in den Kammern vorherrschende O_2-Gehalt in Form einer O_2-Konzentration angegeben. Die

Berechnung letzterer wird vom Programm DatLab 4 übernommen. DatLab4 benötigt hierfür folgende Messwerte: 1. das Rohsignal R1, das der O_2-Konzentration des an den Umgebungsdruck der Luft äquilibrierten Messmediums entspricht; 2. die Temperatur; 3. den im OXYGRAPH-2k gemessenen barometrische Druck; 4. den O_2-Partialdruck in mit Wasserdampf gesättigter Luft in Abhängigkeit von Temperatur, barometrischem Druck und der O_2-Löslichkeit S_{O2} in purem Wasser als einer Funktion der Temperatur; 5. den F_M (siehe 2.4.2.) des Inkubationsmediums; 6. den Messpunkt R0, der einer O_2-Konzentration von 0 nmol/ml (Nanomol pro Milliliter) entspricht [Gnaiger 2008 e]. Während des Äquilibrierungsvorganges gleicht sich der O_2-Partialdruck des Mediums dem der Luft an, das heißt, die Partialdrücke der Flüssigkeit und der Gasphase sind gleich [Gnaiger 2005-2006]. Dies trifft aber nicht für die O_2-Konzentrationen der beiden Phasen zu, denn die O_2-Konzentration der Gasblase ist deutlich höher als die der liquiden Phase [Gnaiger 2005-2006]. Der gelöste O_2-Anteil ist bei konstanter Temperatur und Zusammensetzung der Lösung proportional zum O_2-Partialdruck [Gnaiger 2005-2006]. Die Proportionalitätskonstante, mit deren Hilfe nun die O_2-Konzentration der liquiden Phase berechnet werden kann, ist die Sauerstofflöslichkeit S_{O2}, die in purem Wasser bei 37 °C 10,56 µM/kPa (Mikromol pro Kilopascal) beträgt [Gnaiger 2005-2006]. R0 ist entweder aus Messungen mit Mitochondrien oder Zellsuspensionen mit vollständiger O_2-Depletion in den Kammern oder alternativ aus Experimenten mit 2-5 %-Natriumdithionit- oder Natriumsulfitlösungen bekannt [Gnaiger 2004-2006 b]. Bei der kontinuierlichen Messung der O_2-Konzentration muss der Einfluss des Sensors auf den O_2-Gehalt des Mediums berücksichtigt werden [Gnaiger 2001-2007; Gnaiger 2008 e; Gnaiger und Lassnig 1997-2006]. Dieser lässt sich aus zwei Teilaspekten zusammensetzen: einerseits steigt der O_2-Verbrauch durch den Sensor mit dem O_2-Partialdruck in der Kammer an, andereseits kommt es bei niedrigen O_2-Konzentrationen zunehmend zu einer O_2-Rückdiffusion des an den Sensor gebundenen O_2 in das Medium, die je nach O_2-Partialdruck in der Kammer stark varriieren kann und bei sinkendem O_2-Gehalt an Bedeutung zunimmt. Damit verschleiert der Sensor den tatsächlichen Verbrauch der Probe, da er beim Abfall der O_2-Konzentration mehr O_2 in das Medium abgibt [Gnaiger 2001-2007; Gnaiger 2004-2006 a; Gnaiger 2008 e]. Bei großen Mengen an Mitochondrien ist der O_2-Verbrauch durch die Organellen so hoch, dass trotz der Rückdiffusion eine O_2-Konzentration von 0 nmol/ml erreicht werden kann. Liegt eine geringe Probengröße vor, so kann es dazu kommen, dass der O_2-Verbrauch durch die Mitochondrien durch die Rückdiffusion von O_2 kompensiert werden kann, es stellt sich also ein steady-state ein [Gnaiger 2001-2007; Méndez und Gnaiger 1994]. Um eine so verursachte Verfälschung

der Ergebnisse korrigieren zu können, muss dem Programm der Anteil der Rückdiffusion an der bestimmten O_2-Konzentration bekannt sein. Dazu müssen im Vorfeld Messungen zur Determinierung der Rückdiffusion vorgenommen werden [Gnaiger 2008 e]. Für gewöhnlich liegt sie bei einem Partialdruck von 0 nmol/ml bei -2 pmol/(s*cm^3) (Picomol pro Sekunde und Kubikzentimeter), wenn von einem Temperaturbereich von 25-37 °C und einem Kammervolumen von 2 ml ausgegangen wird [Gnaiger 2001-2007]. Die abgebildeten Graphen sind schon um die O_2-Rückdiffusion korrigiert, so dass diese unter Verwendung der angzeigten Werte bei den Berechnungen nicht mehr berücksichtigt werden muss. Der im OXYGRAPH-2k bestimmte O_2-Verbrauch lässt sich nicht ausschließlich auf die Komplexe der Atmungskette zurückführen, sondern ist zusammengesetzt aus der mitochondrialen Atmung, dem O_2-Verbrauch durch Protonenlecks und der Produktion von ROS [Boushel et al. 2007; Gnaiger 2003, 2008 e; Gnaiger et al. 2000 b] sowie O_2-konsumierender chemischer Reaktionen der im Rahmen des Protokolls verwendeten Substrate (z.B. Cytochrom c, Ascorbat und TMPD (Tetramethyl-p-phenylendiamin), dem künstlichen Elektronendonator für die COX). Während des Versuches wurde strengstens darauf geachtet, dass die O_2-Partialdrücke nicht unter 100 nmol/ml abfallen und gegebenenfalls etwa 10 ml reiner O_2 (MTI Industriegase, Ulm, Deutschland) in die Luftblase der geöffneten Kammer verabreicht. Hierdurch wird eine Verfälschung durch die Rückdiffusion des O_2 ins Medium gering gehalten. Um den Einfluss der Protonenlecks und der ROS zu erfassen, werden während des Protokolls Rotenon (Hemmung Komplex I) und Antimycin A (Hemmung Komplex III) verabreicht, wodurch der O_2-Verbrauch durch die Atmungskette zum Erliegen kommt und die verbleibende O_2-Abnahme nur noch auf die nicht-mitochondrialen Prozesse zurückzuführen ist. Die gemessenen Werte werden um diese Hintergrundprozesse korrigiert [Boushel et al. 2007; Gnaiger 2003, 2008 e; Gnaiger et al. 2000 b] (siehe auch Abschnitt 4.2.1.6.).

2.5. Präparation der Gewebeproben

Nach Gewinnung der Leberbiopsate wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung, die meist direkt oder nur wenige Minuten nach der Entnahme erfolgte, in 1,8 ml Custodiol-Lösung im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Präparation des 1,5-2,0 mg schweren Gewebestücks wurden Deckel und Boden einer Petrischale jeweils mit 2 ml MiR05-Lösung gefüllt. Das Zuschneiden der Gewebeprobe geschah auf dem Deckel der Petrischale mit einem Skalpell (Carbon steel Einmalskalpell Aeskulap Division B. Braun, Aeskulap AG & Co. KG Tuttlingen, Deutschland) und einer Pinzette (Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs-GmbH,

Heidelberg, Deutschland). Dabei wurde darauf geachtet, möglichst viel Leberparenchym und nur wenig bis kein Kapselgewebe zu entnehmen. Um dem Gewebe überschüssige Flüssigkeit zu entziehen, wurde es kurz auf ein Stück Filterpapier gelegt und anschließend auf dem in der Waage (Scaltec SBC31, Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland) befindlichen Petrischalenboden gewogen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe in der Petrischale in einer mit Eis gefüllten Styroporbox aufbewahrt. Auf diese Weise wurden pro Versuchstier zwei Gewebeproben angefertigt. Zur mechanischen Permeabilisierung wurde das Gewebe in den Petrischalenböden mit einer spitzen und einer runden Pinzette (Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs-GmbH, Heidelberg, Deutschland) vorsichtig auseinander gezogen, bis die rötliche Färbung verschwand und die einzelnen Fasern des Leberparenchyms nur noch lose miteinander verbunden waren. Dabei fixierte die gebogene Pinzette das Biopsat in der Mitte, während mit der spitzen Pinzette die Ränder nach außen gezogen wurden. Danach wurden die Petrischalen gut mit Eis bedeckt in einer Styroporschale geschwenkt, um alle Substrate aus den Zellen herauszuspülen. Anschließend wurde je ein Gewebestück mit Hilfe der geschlossenen spitzen Pinzette in die beiden Kammern des OXYGRAPH-2k gegeben. Vor Beginn der Messung wurden die Daten (Gewebeart, Gewicht, Konzentration des Gewebes pro ml, Art des Lösungsmediums, Kammervolumen), unter „Experiment: Edit“ eingetragen. Die Darstellung der Parameter wurde in „Specific Flux per Unit“ gewählt, wodurch die Atmungsaktivität pro mg Gewebe in pmol/(s*mg) (Picomol pro Sekunde und Milligramm) angegeben wird.

2.6. Messung der mitochondrialen Atmung

2.6.1. Allgemeines

Das Prinzip der Untersuchung der Atmungskette basiert darauf, durch gezielte Stimulation und Inhibition der Komplexe ihren Einfluss auf die Atmungsaktivität zu bestimmen. Hierzu ist es nötig, dass die Mitochondrien frei vorliegen und somit von von außen zugefügten Substraten abhängig sind. Dieses wurde durch die Gewebepräparation erreicht, bei der die endogenen Substanzen durch die Permeabilisieren freigelegt und über das Schwenken in MiR05 aus der Zelle herausgespült wurden. Bei der Festlegung der verabreichten Mengen wurde darauf geachtet, die Substrate im Überschuss zu geben, um einer Limitierung der Effekte durch Substratmangel vorzubeugen. Die Angaben in den Klammern entsprechen der Endkonzentration der Stoffe im Inkubationsgemisch. Zwischen dem Hinzufügen zweier Substanzen wurde immer abgewartet (Wartezeiten siehe Tabellen), bis sich die durch

die Injektion verursachten Unregelmäßigkeiten des O_2-Flusses beruhigt hatten und ein konstantes Plateau der Atmung anzeigte, dass der Stoff seine volle Wirkung entfaltet hatte.

2.6.2. Protokoll der Permeabilitätsmessungen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, wurden die Messungen an Gewebeproben vorgenommen, die, entgegen der gängigen Methode der chemischen Permeabilisierung mit Digitonin, mechanisch permeabilisiert wurden. Da dieses Verfahren bis jetzt erst an Gewebe aus der Leber des Schweins angewendet wurde [Kuznetsov et al. 2002], war es wichtig, zu Beginn der Messungen erst zu überprüfen, ob sich diese Technik ohne weiteres auch auf das Lebergewebe der Maus übertragen lässt. Hierfür wurden Permeabilitätsmessungen mit Digitonin durchgeführt, bei denen interessierte, ob sich durch das Digitonin ein Anstieg der Atmungsaktivität verzeichnen ließ, was dann ein Beweis dafür gewesen wäre, dass die Zellen durch die mechanische Vorgehensweise doch noch nicht ganz durchlässig für die Substrate der mitochondrialen Atmung sind. Zur Überprüfung dieser Methodik wendeten wir vorerst ein etwas einfacheres Protokoll an, bevor wir bei der Analyse der Temperatureffekte die Komplexe I und II parallel stimulierten. Bei der Untersuchung der Funktion isolierter Mitochondrien wird gerne auf das Modell der „Respiratory Steady States“ nach Chance und Williams zurückgegriffen, die bei oxygraphischen Experimenten mit isolierten Mitochondrien den Aktivierugszustand der Atmung in Abhängigkeit vom stimulierenden Substrat in unterschiedliche Stadien unterteilen [Gnaiger 2008 d; Chance und Williams 1955 b]. Dabei beschreibt der State 1 den isolierten Zustand der Mitochondrien im Nährmedium ohne Zugabe von Substraten von außen. Der State 2, ein Substrate-limitierter Ruhezustand, wird durch das Hinzufügen von ADP (Adenosindiphosphat) erreicht, was nach einer kurzen Aktivierungsphase zu einer Erschöpfung auch der letzten endogenen Substrate führt, sodass die Mitochondrien nun zur Atmung auf eine Substitution der Substanzen von extern angewiesen sind. Der State 3 wird nun durch die Gabe von Substanzen, z.B. Malat und Glutamat zur Stimulierung des Komplex I, hervorgerufen, wodurch die Substratlimitierung des State 2 aufgehoben wird. Nun kann eine hohe Zellatmung mit ATP-Produktion betrieben werden. Nachdem alles ADP in ATP umgewandelt und so dem Nährmilieu entzogen wurde, setzt der ADP-begrenzte Ruhezustand, der State 4, ein. Wenn alles O_2 im Medium aufgebraucht ist, liegt der State 5 vor, bei dem trotz erneuter Gabe von ADP keine Zellatmung mehr betrieben werden kann [Gnaiger 2008 d; Chance und Williams 1955 b]. Estabrook entwickelte 1967 ein alternatives Protokoll, dass eine leichte Abwandlung der von Chance und Williams entwickelte Einteilung darstellt. Es unterschei-

det sich von seinem Vorbild darin, dass der State 2 durch die Gabe der Substrate zur Anregung der Komplexe I bzw. II eingeleitet wird, ohne vorher ADP zu applizieren, sodass dieses Stadium durch ein Minderangebot an ADP limitiert wird. ADP wird erst im folgenden Schritt zur Erschaffung des State 3 gegeben, sodass nun auch hier eine schnelle Atmung mit ATP-Produktion möglich wird. Der State 4 zeichnet sich wieder durch einen Mangel an ADP aus, der die Atmungsaktivität einschränkt. Im State 5 herrscht ein Unterangebot an O_2, dass die Zellatmung zum Erliegen bringt [Gnaiger 2008 d; Estabrook 1967]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine isolierten Mitochondrien, sondern permeabilisierte Zellen verwendet wurden, orientierte sich das benutzte Protokoll an dem Modell der Respiratory Steady States nach Chance und Williams bzw. seiner Abwandlung nach Estabrook. Es wich lediglich in drei Punkten vom alternativen Protokoll ab: 1. durch die direkte Gabe der Substanzen in das Nährmedium wurde der State 1 übergangen; 2. der Sate 5 trat niemals ein, weil bei einem zu starken Abfall der O_2-Konzentration in den Kammern der Partialdruck des Gases im Medium von außen mit O_2 angehoben wurde und 3. wurde bei unserem Protokoll zumindest bei der Untersuchung der Temperatureffekte, eine sogenannte Entkopplung u (uncoupling) mit FCCP vorgenommen. Bei der Entkopplung wird ein passiver Rückstrom von Protonen ermöglicht, wodurch der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran zusammenbricht [Löffler und Petrides 2003]. Nun wird der Elektronentransport nicht mehr von der ATP-Synthetase gesteuert [Gnaiger 2008 e; Gnaiger et al.1998 c] und die Komplexe müssen ihre maximalen Kapazitäten ausschöpfen, um dem Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials entgegenzuwirken [Gnaiger 2008 e; Hütter et al. 2007; Löffler und Petrides 2003]. Die Einteilung der States nach dem alternativen Protokoll nach Estabrook einschließlich der Entkoplung veranschaulicht Tab. 3. Da die Initialisierung der States je nach Strukur des Protokolls variiert, werden bei den in der Arbeit verwendeten Protokollen jeweils tabellarisch die einzelnen States aufgeführt.

Tab. 3: Überblick über die Steady States der mitochondrialen Atmung nach Estabrook

ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; ETS: Electron Transport System; O_2: Sauerstoff; u: uncoupling.

State	Beschreibung
1	Isolierte Mitochondrien im Nährmedium ohne Zugabe stimulierender Substrate von außen
2	Gabe von Substraten für Komplex I bzw. II; Atmung limitiert durch einen Mangel an ADP
3	Schnelle gekoppelte Atmung durch Gabe von ADP
4	Alles ADP ist in ATP umgewandelt, daher nun nur noch langsame Atmung möglich
5	Limitierung der Atmung durch einen Mangel an Sauerstoff
u	Entkopplung (maximale Kapazität der ETS mit Überschuss an O_2 und Substraten)

Nachdem das Gewebe in die Kammern gegeben wurde, wurde vor dem Verschließen durch Injektion von etwa 10 ml reinem O_2 (Sauerstoff Westfalen, Münster, Deutschland) mit einer 50 ml-Spritze (B. Braun, Melsungen, Deutschland) in die Gasblase über den Rührern die O_2-Konzentration des Mediums auf 350 bis 400 nmol/ml gesteigert. Bei Bedarf wurde im Verlauf dieser Reoxygenierungsvorgang der Kammern wiederholt. Um durch Stimulation von Komplex I den State 2 einzuleiten, wurden dem Medium als erster Schritt mittels Hamilton-Spritzen (Hamilton Company Europe, Bonaduz, Schweiz) 12,5µl Malat (5mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 10 µl Glutamat (10 mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt [Gnaiger 2008 c]. Malat ist das Substrat der Malatdehydrogenase des Zitratzyklus in der Matrix und wird von dieser zu Oxalacetat unter Bildung von NADH oxidiert. Es gelangt über einen Dicarboxyl-Carrier im Austausch gegen HPO_4 (Hydrogenphosphat) ins Mitochondrium. Da unsere Gewebeproben mechanisch permeabilisiert wurden, fehlt nun das zytosolische Acetyl-CoA (CoA: Coenzym A) zum Abbau von Oxalacetat, das sich in der Folge im Organell anreichert. Diese Akkumulation kommt dadurch zustande, dass Oxalacetat die innere Membran nicht durchwandern kann. Gleichzeitig laufen aber auch die Folgereaktionen des Zitratzykluses nicht ab, weil Zitrat und 2-Oxoglutarat gegen Malat aus dem Mitochondrium heraustransportiert, aber nicht nachgebildet werden. Succinat verlässt ebenfalls über einen HPO_4-Succinat-Antiporter die Matrix. Folglich reicht Malat nicht als Lieferant für Elektronen des Komplexes I aus, da hier zu wenige NADH entstehen [Gnaiger 2008 c]. Um die Blockade durch Ansammlung von Oxalacetat zu umgehen, fügt man Glutamat hinzu. Dieses überwindet die innere Membran über einen Glutamat/OH^--Austauscher (OH^-: Hydroxylgruppe). Dadurch kann jetzt Oxalacetat in einer Art Ersatzreaktion für den natürlichen Abbau mittels Transaminase zusammen mit Glutamat zu Aspartat und 2-Oxoglutarat reagieren. Dieses wird noch auf eine andere Weise von Glutamat, nämlich über die Abspaltung eines Ammoniumions unter Bildung von NADH, generiert. Ein Überschuss an 2-Oxoglutarat wird verhindert, indem es, sofern es nicht unter Produktion von NADH und CO_2 (Kohlenstoffdioxid) zu Succinat weiterreagiert, über einen 2-Oxoglutarat/Malat-Antiporter aus dem Mitochondrium entfernt wird. Das entstehende Aspartat eröffnet nun auch dem Glutamat über einen Glutamat/Aspartat-Austauscher eine zweite Möglichkeit, in die Matrix zu gelangen [Gnaiger 2008 c]. Zusammen erreichen Malat und Glutamat eine ausreichende Anzahl an NADH, um den Komplex I zu stimulieren. Da die Glycerophosphatdehydrogenase und die β-

Oxidation, die unter physiologischen Bedingungen ebenfalls Elektronen auf das Ubiquinon übertragen, in den untersuchten permeabilisierten Zellen als Elektronendonatoren wegfallen, ist der Komplexe I unter den hier herrschenden Bedingungen die einzigen Möglichkeiten für negative Ladungen, in das ETS einzutreten [Gnaiger 2008 a]. Um zu verhindern, dass im Laufe des Experiments ein Mangel an Substraten im Medium entsteht, ist es wichtig, die Substanzen im Überfluss zu verabreichen [Gnaiger 2008 c]. Die Vorgänge im Mitochondrium unter Malat und Glutamat werden in Abb. 3 veranschaulicht. Im Anschluss spritzte man 10 µl ADP (2,5 mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), wodurch einerseits die Atmung von Komplex I maximal stimuliert und andererseits die Pro-

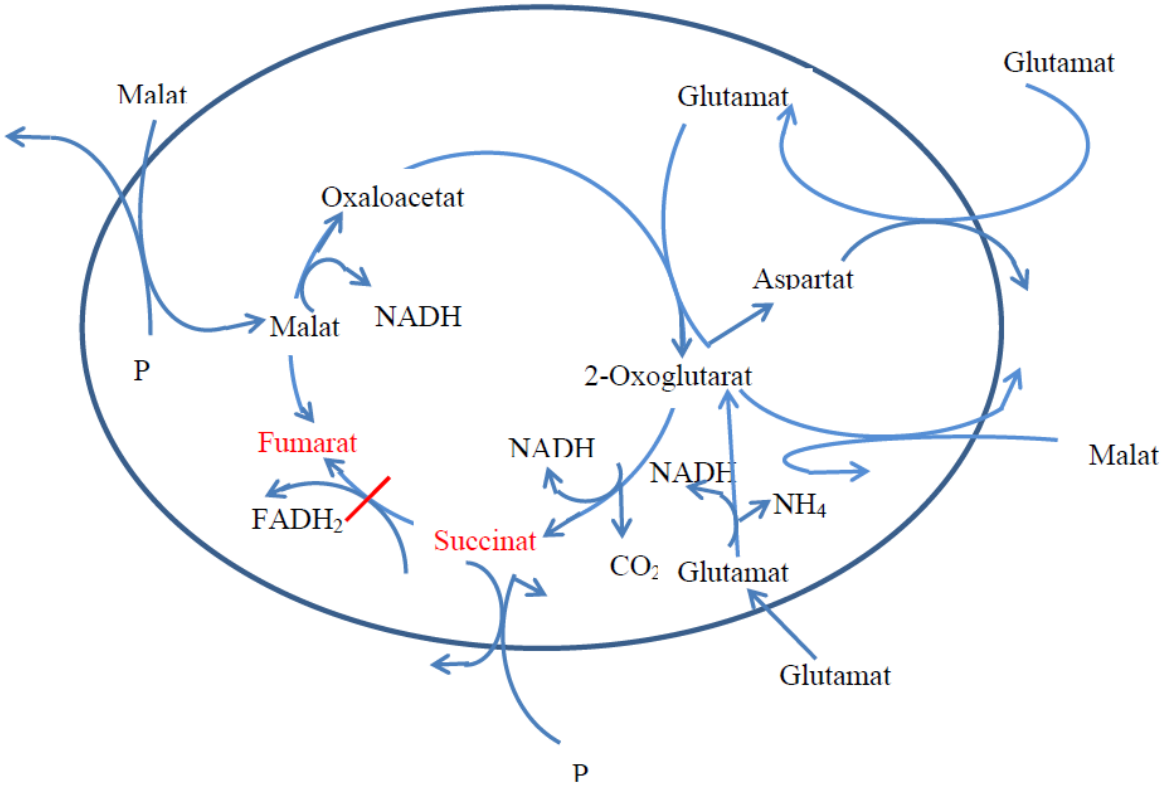

Abb. 3: Schema der Stoffwechselwege unter Malat und Glutamat (modifiziert nach Gnaiger 2008 c)
CO_2: Kohlenstoffdioxid; $FADH_2$: Flavinadenindinukleotid; NADH: Nikotinamidadenindinukleotid; NH_4: Ammoniumion; P: anorganisches Phosphat. Farben: Dunkelblau: Mitochondrium; Hellblau: ablaufende Stoffwechselwege; Rot: gehemmte Stoffwechselwege.

duktion von ATP ermöglicht wurde [Gnaiger 2008 c]. Damit lag ein State 3 mit maximaler gekoppelter Atmung bei Eintritt der Elektronen ins ETS nur über den Komplex I vor. Dann wurde das Experiment mit der Gabe von 20 µl Succinat (10 mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) fortgeführt. Wie in Abb. 3 zu sehen ist, bricht bei der alleinigen Gabe von Malat und Glutamat als Substrate der Ersatz-Zitronensäurenzyklus durch den ständigen Abfluss des Succinats an der Stelle ab, wo dieses über die Succinatdehydrogenase in

Fumarat umgewandelt werden sollte. Um nun den Zitratzyklus-Ersatzkreis zu schließen, ist es nötig, das Succinat von außen im Überfluss zu substituieren. Mit der Succinat-Gabe wird die Einschleusung von Elektronen ins ETS über den an der inneren Membran gebundenen Komplex II (Succinatdehydrogenase) mittels $FADH_2$ angeregt [Gnaiger 2008 b]. Dieses $FADH_2$ entsteht bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat, das wiederum von der Fumarase in Malat umgewandelt wird [Gnaiger 2008 c]. Damit schließt sich der Kreis und es herrscht ein State 3 mit maximaler gekoppelter ATP-Produktion bei synchronem Elektronenfluss über die Komplexe I und II (siehe auch Abb. 4). Jetzt wurden 10 µl Digitonin

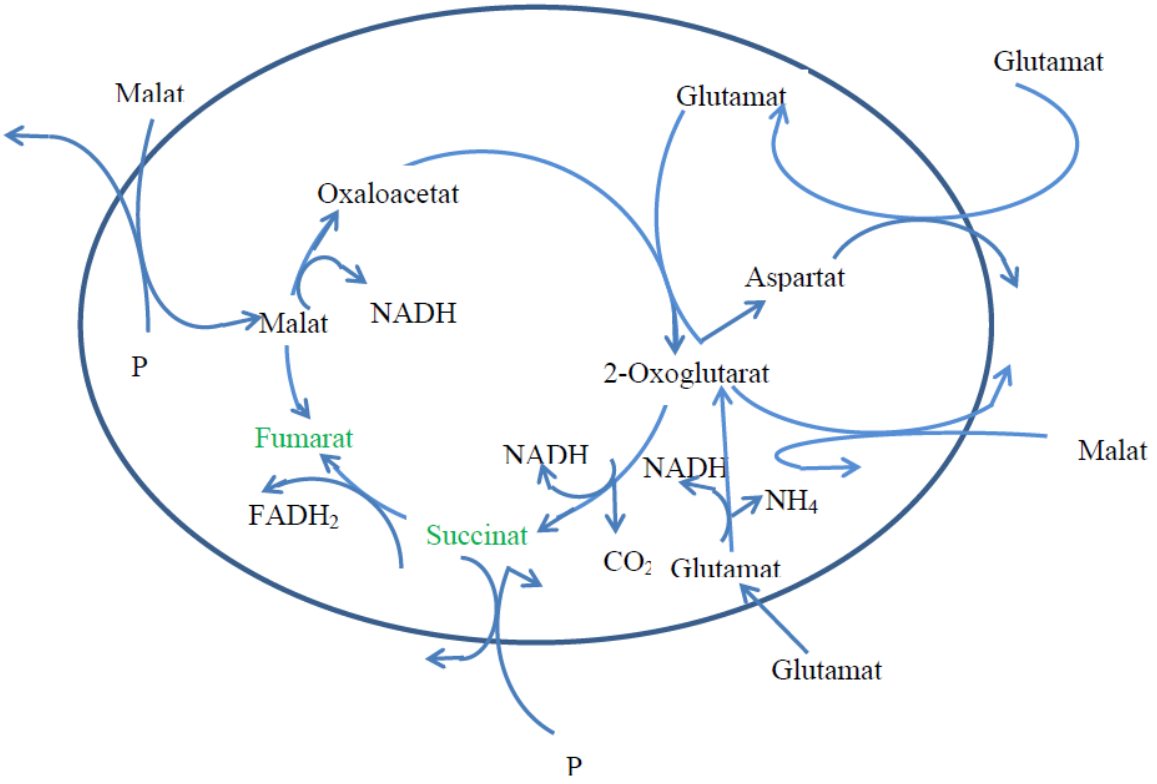

Abb. 4: Schema der Stoffwechselwege unter Malat, Glutamat und Succinat (modifiziert nach Gnaiger 2008 a)

CO_2: Kohlenstoffdioxid; $FADH_2$: Flavinadenindinukleotid; NADH: Nikotinamidadenindinukleotid; NH_4: Ammoniumion; P: anorganisches Phosphat. Farben: Dunkelblau: Mitochondrium; Hellblau: ablaufende Stoffwechselwege; Grün: nun nicht mehr gehemmte Stoffwechselwege.

(40,5 µM (Mikromol); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verabreicht. Eine der Eigenschaften von Saponinen ist es, Membranen aufzulösen [Fallert-Müller et al. 2000]. Dieser Effekt wurde hier genutzt, um zu Überprüfen, ob die Zellen durch die mechanische Methode ausreichend pemeabilisiert sind. Die unter Succinat und Digitonin gewonnenen Atmungsaktivitäten werden im Ergebnisteil in Form des Vergleichs der Atmung vor und nach Gabe von Digitonin gegenübergestellt, um zu untersuchen, ob sich die Permeabilität

der Zellen und damit der O_2-Verbrauch der Mitochondrien durch das Hinzufügen von Digitonin erhöhen lässt. Nun wurde das Protokoll mit der Gabe von 5 µl Cytochrom c (10 µM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) fortgeführt. Damit wurde überprüft, ob während der Präparation die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran verletzt worden ist, was zu einem Verlust der Substanz geführt hätte. In diesem Fall wäre die gemessene State 3-Atmung durch den Cytochrom c-Mangel begrenzt und könnte erst durch die Substitution der Substanz ihren tatsächlichen Wert erreichen [Gnaiger 2008 c]. Die nach Gabe von Cytochrom c erhaltene Atmungsaktivität wird hier als State 3c bezeichnet. Als nächstes wurde 1 µl Oligomycin (2,5µM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in die Kammern gespritzt. Dieser Stoff ist ein Hemmer der ATP-Synthetase und versetzt die Komplexe der Atmungskette bei maximalem Membranpotential in eine Art „Ruhezustand", in dem die noch gemessene Leckage-Atmung hauptsächlich auf die Kompensation von Protonenlecks und dem Entfleuchen von Elektronen, die dann zur Produktion von ROS beitragen, zurückzuführen ist [Gnaiger 2008 e]. Damit wird versucht, die physiologische Situation, bei der sich die Atmung verlangsamt, weil das gesamte ADP aufgebraucht wurde, nachzuempfinden. Dieses gelingt allerdings nicht ganz, da es durch die komplette Hemmung der ATP-Synthetase nicht nur zu einer Verlangsamung der Atmung, sondern zum vollständigen Erliegen der ATP-Produktion kommt. An diesem Punkt des Protokolls herrscht also nun der State 4 nach Estabrook bzw. Chance und Williams [Gnaiger 2008 d]. Um die in 2.4.5. beschriebene Hintergrundatmung ermitteln zu können, werden zuerst 5 µl Rotenon (0,5µM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und ca. (circa) 20 Minuten später 2 µl Antimycin A (5µM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in das Medium appliziert. Rotenon ist ein Hemmer des Komplexes I, Antimycin A inhibiert den Komplex III (Ubiquinon:Cytochrom c Oxidoreduktase) [Nelson et al. 2005]. Da durch die Hemmung des Komplex I mit Rotenon die Elektronen nur noch über die Succinatdehydrogenase ins ETS eintreten können, wird durch Inhibition von Komplex III indirekt auch sie blockiert und es fließen keine Elektronen mehr dem ETS entlang. Der nun gemessene O_2-Verbrauch wird also nur noch durch die Hintergrundprozesse verursacht. Die im Ergebnisteil angegebenen Atmungsaktivitäten sind bereits um den nach Antimycin A-Gabe erhaltenen O_2-Verbrauch berichtigt. Tab. 4 gibt einen Überblick über die Substrate, ihre Funktion sowie die sie vertretenden Parameter im Ergebnisteil.

Tab. 4: Übersicht über das Protokoll der Permeabilitätsmessungen

ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; ca.: circa; c: Cytochrom c; CI-III: Komplex I-III; O_2: Sauerstoff; ETS: Electron Transport System. Grau hinterlegt: Wartezeiten zwischen den einzelnen Substratgaben.

Substrat	Funktion	State	Parameter
Malat **Glutamat**	Stimulation CI	2	-
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
ADP	Maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion bei Einschleusung der Elektronen nur über CI	3	-
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
Succinat	Stimulation CII → maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion bei synchronem Elektronenfluss über CI und CII	3	-
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
Digitonin	Chemische Permeabilisierung der Zellmembran	3	● Vergleich der Atmung vor und nach Gabe von Digitonin
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
Cytochrom c	Substitution eventueller Cytochrom c-Verluste durch Membranschäden bei der Präparation	3c	-
	Plateau ca. 5-10 Minuten abwarten		
Oligomycin	Hemmung der ATP-Synthetase	4	-
	Plateau ca. 20 Minuten abwarten		
Rotenon	Hemmung CI	-	-
	Plateau ca. 20 Minuten abwarten		
Antimycin A	Hemmung CIII → kein Elektronenfluss mehr über das ETS möglich → Bestimmung des O_2-Verbrauchs durch Hintergrundprozesse	-	-

2.6.3. Messung der Temperatureffekte

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Mitochondrien aus mechanisch permeabilisierten Leberzellen bei der Untersuchung im OXYGRAPH-2k auf eine Gabe von Substraten von

außen ansprachen, konnte nun der zweite Teil der Experimente, die Messung der Temperatureffekte, durchgeführt werden. Hierbei wendeten wir nun ein komplexeres Protokoll mit simultaner Stimulation der Komplexe I und II an. Nach der Gewebezugabe wurden die Kammern sofort verschlossen und 12,5µl Malat (5mM), 10 µl Glutamat (10 mM) und 20 µl Succinat (10 mM) injiziert. Um den Zellen ein Maximum an O_2 zur Verfügung zu stellen, wurde wieder etwa 10 ml reiner O_2 substituiert. Malat und Glutamat fungieren als Stimulatoren des Komplexes I [Gnaiger 2008 c], während Succinat das Substrat des Komplexes II darstellt [Gnaiger 2008 b]. Damit liegt hier schon zu Beginn ein geschlossener Ersatz-Zitratzyklus mit synchronem Elektronenfluss über die Komplexe I und II vor. Die unter Malat, Glutamat und Succinat gemessene und im Ergebnisteil als State 2-Atmung dargestellte Atmungsaktivität entspricht dem State 2 nach Estabrook, bei dem die Substrate für die NADH-Dehydrogenase und die Succinatdehydrogenase im Überschuss vorhanden sind, aber die Atmung durch einen Mangel an ADP limitiert wird [Gnaiger 2008 d]. Da zu einem späteren Zeitpunkt im Protokoll eine Entkopplung mit FCCP vorgenommen wurde, wird im Ergebnisteil die State 2-Atmung unter Malat, Glutamat und Succinat noch ins Verhältnis zur Entkopplung mit FCCP gesetzt, um beurteilen zu können, wie hoch die ADP-limitierte State 2-Atmung im Vergleich zur maximalen Kapazität des ETS ist. Anschließend wurden 10 µl ADP (2,5 mM) zur Aufhebung des ADP-Mangels appliziert. ADP ist eine Voraussetzung zur Produktion von ATP und stimuliert die Mitochondrien zur maximalen Atmung [Gnaiger 2008 d]. Damit lag zu diesem Zeitpunkt ein State 3 vor, bei dem ADP die unter den Ergebnissen aufgeführte maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Synthese bei einem parallelen Elektronenfluß über die Komplexe I und II ermöglicht [Gnaiger 2008 d]. Um nun die Effekte der ADP-Gabe auf die Atmungskette besser fassbar zu machen, wurde im Ergebnisteil zusätzlich zur gekoppelten Atmung mit ATP-Synthese (State 3) noch die RCR (Respiratory Control Ratio) der Komplexe I und II (RCR von Komplex I und II) sowie die CI (Complex I) +CII (Complex II) Ratio unter ADP berechnet. Die RCR gibt an, welchen Effekt das Hinzufügen einer Substanz auf die Komplexe ausübt, das heißt, wie stark sich der O_2-Verbrauch durch das Substrat verändert. Um die RCR von Komplex I und II unter ADP zu kalkulieren, wurde der State 3 unter ADP zur State 2-Atmung unter Malat, Glutamat und Succinat ins Verhältnis gesetzt. Die CI+CII Ratio unter ADP bildet nun den Quotienten aus der Atmung der Komplexe I und II (gemessen nach ADP-Applikation) und der Atmung nach FCCP-Gabe, um auch hier einen Vergleich zwischen State 3-Atmung und maximaler Kapazität der Komplexe nach Entkopplung anzustellen. Nach Einstellung einer konstanten Atmungsaktivität wurden 5 µl Cytochrom c (10 µM) gespritzt,

um etwaige Verluste dieser Substanz auszugleichen [Gnaiger 2008 c]. Damit ist nun auch in diesem Protokoll der sog. State 3c erreicht, bei dem eine maximal gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion über einen gleichzeitigen Elektroneneinstrom über die Komplexe I und II nach Substitution eventueller Cytochrom c-Einbußen zu finden ist. Im Ergebnisteil werden die Effekte des Cytochrom c in Form der State 3c-Atmung, der Cytochrom c Control Ratio, der Cytochrom c Ratio und der RCR der Komplexe I und II unter Cytochrom c wiedergegeben. Die Cytochrom c Control Ratio zeigt die Erhöhung der Atmungsaktivität durch Cytochrom c in Relation zur Atmung unter ADP. Ähnlich wie die CI+CII Ratio unter ADP, stellt auch die Cytochrom c Ratio die State 3c-Atmung der entkoppelten Atmung unter FCCP gegenüber. Da nun die möglichen Verluste an Cytochrom c ausgeglichen sind, muss jetzt auch die RCR der Komplexe I und II mit der State 3c-Atmung statt der State 3-Atmung unter ADP erneut berechnet werden. Zur Initiierung eines State 4 wurde 1 µl Oligomycin (2,5µM) zur Hemmung der ATP-Synthetase in jede Kammer injiziert [Gnaiger 2008 e]. Die zur Beschreibung des Einflusses von Oligomycin nötigen Parameter sind die State 4-Atmung und die Leak Respiratory. Die Leak Respiratory veranschaulicht den Abfall der Atmung durch die Hemmung der ATP-Synthetase mit Oligomycin im Vergleich zur State 3c-Atmung. Im Anschluss wurde so lange FCCP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 1µl-Schritten (0,05 µM) titriert, bis sich ein maximaler Anstieg der Atmung zeigte. Dabei war es wichtig, nicht zuviel FCCP zu verabreichen, da dieses in zu hohen Mengen die Atmungskette inhibiert [Gnaiger 2008 e]. Wie bereits erörtert, zeigt sich die maximale Kapazität des ETS in Gestalt der im Oxygraphen bestimmten Atmung nach Entkopplung mit FCCP. Weitere Repräsentanten der Effekte der Entkopplung sind die RCR von FCCP, die $UCR_{u/D}$ (Uncoupling Control Ratio, u: entkoppelt; D: ADP) und die $UCR_{u/c}$ (c: Cytochrom c). Die RCR von FCCP beschreibt den Anstieg des O_2-Verbrauchs durch die Gabe von FCCP im Vergleich zur State 4-Atmung unter Oligomycin. Die UCR setzt die durch FCCP entkoppelte Atmungsaktivität ins Verhältnis zur State 3-Atmung unter ADP ($UCR_{u/D}$) bzw. zur State 3c-Atmung nach Substitution eventueller Cytochrom c-Verluste ($UCR_{u/c}$). Da der O_2-Verbrauch unter FCCP sehr groß war, musste nun reoxygeniert werden. Zur Bestimmung der Hintergrundatmung wurden abermals 5 µl Rotenon (0,5µM) und 2 µl Antimycin A (5 µM) verabreicht. Um nun trotz der kompletten Hemmung der elktroneneinschleusenden Prozesse den Komplex IV untersuchen zu können, wurden nun zuerst 5µl Ascorbat (2 mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und dann sofort 5µl TMPD (0,5 mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gegeben. TMPD dient als Elektronendonator für die COX [Kuznetsov et al. 2001-2007]. Ein Nach-

teil von TMPD ist, dass es in Anwesenheit von reinem O_2 schnell unter Bildung von Superoxid-Radikalen und Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Um diese Effekte möglichst gering zu halten, ist es notwendig, vor Applikation von TMPD Ascorbat zur Regeneration des reduzierten TMPDs hinzuzufügen [Kuznetsov et al. 2001-2007]. Nachdem kurz ein Plateau abgewartet wurde, wurde die O_2-Konzentration auf 350-400 nmol/ml angehoben und eine weitere Reoxygenierung erst 5-10 Minuten später nach dem Einstellen eines konstanten O_2-Wertes vorgenommen. Jetzt wurden 2 µl KCN (Kaliumcyanid; 1 mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in die Kammern injiziert und über etwa 15 Minuten hinweg das Einpendeln auf ein gleichmäßiges Niveau beobachtet. Anschließend wurde noch einmal der O_2-Verbrauch ausgeglichen und 5-10 Minuten ein letztes Plateau abgewartet. KCN ist ein Hemmer der COX. Folglich ist die nach Gabe von KCN gemessene Atmung nur auf die Autooxidation von TMPD, Ascorbat und Cytochrom c zurückzuführen [Kuznetsov et al. 2001-2007]. Aus diesen Werten wird im Ergebnisteil die Aktivität des Komplex IV berechnet. Die Atmung des Komplex IV wird mittels CIV (Complex IV) Ratio mit der Atmung nach FCCP verglichen. Tab. 5 fasst das Protokoll mit den States und den entsprechenden Parametern zusammen.

Tab. 5: Übersicht über die States der Temperaturmessungen

ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; c: Cytochrom c; ca.: circa; CI-IV: Komplex I-IV; ETS: Electron Transport System; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; KCN: Kaliumcyanid; nmol/ml: Nanomol pro Milliliter; O_2: Sauerstoff; RCR: Respiratory Control Ratio; TMPD: Tetramethyl-p-phenylendiamin; $UCR_{u/D}$: Uncoupling Control Ratio, u: uncoupling, D: ADP; $UCR_{u/c}$: Uncoupling Control Ratio, u: uncoupling, c: Cytochrom c.

Substrat	Funktion	State	Parameter
Malat/Glutamat/Succinat	Stimulation CI und CII	2	● State 2-Atmung; State 2-Atmung im Vergleich zur entkoppelten Atmung
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
ADP	Maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion bei synchronem Elektronenfluss über CI und CII	3	● State 3-Atmung ● RCR von CI und II unter ADP ● CI+CII Ratio unter ADP
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
Cytochrom c	Substitution eventueller Cytochrom c-Verluste durch Membranschäden bei Präparation	3 c	● State 3c-Atmung; Cytochrom c Ratio ● Cytochrom c control Ratio ● RCR von CI und II unter Cytochrom c
	Plateau ca. 5-10 Minuten abwarten		
Oligomycin	Hemmung der ATP-Synthetase	4	● State 4-Atmung; Leak Respiratory
	Plateau ca. 20 Minuten abwarten		
FCCP	Entkopplung	u	● Atmung nach Entkopplung mit FCCP ● RCR von FCCP; $UCR_{u/D}$; $UCR_{u/c}$
	Reoxygenieren		
Rotenon	Hemmung CI	-	-
	Plateau ca. 20 Minuten abwarten		
Antimycin A	Hemmung CIII→ kein Elektronenfluss über das ETS → O_2-Verbrauch nur durch Hintergrundprozesse	-	-
	Plateau ca. 20 Minuten abwarten		
Ascorbat **TMPD**	Regeneration des TMPD Artifizieller Elektronendonator für CIV	-	- ● Atmung CIV
	Plateau ca. 5-10 Minuten abwarten		
	Reoxygenieren		
	Plateau ca. 5-10 Minuten abwarten		
KCN	Hemmung CIV → O_2-Verbrauch durch Oxidation von TMPD/Ascorbat/Cytochrom c→ Berechnung Atmung CIV	-	● Atmung CIV ● CIV Ratio
	Plateau ca. 15 Minuten abwarten		
	Reoxygenieren		
	Plateau ca. 5-10 Minuten abwarten		

2.6.4. Messungen bei 30 °C in den Kammern des Oxygraphen

Bei Voruntersuchungen, um sich mit der Methodik vertraut zu machen, wurden auch Experimente an Biopsien aus Mäuselebern durchgeführt, bei denen in der Messkammer Temperaturen von 30 °C herrschten. Nach der Gabe des Gewebes in Kammern wurde dem Medium 12,5 µl Malat (5mM) und 10µl Glutamat (10 mM) zur Stimulation des Komplexes I beigefügt [Gnaiger E 2008 c]. Damit lag ein State 2 vor. Diese Werte werden im Ergebnisteil als State 2-Atmung des Komplex I angegeben. 8 µl ADP (2 mM) wurden nun zur Initialisierung des State 3 des Komplex I injiziert, wodurch eine schnelle ATP-Produktion ermöglicht wurde. Mit den hier erhaltenen Atmungsaktivitäten lassen sich nun einerseits die gekoppelte Atmung des Komplex I mit ATP-Synthese bei Elektronenfluss über den Komplex I und andererseits die RCR des Komplex I unter ADP bestimmen. Letztere beschreibt die Atmung nach Stimulation mit ADP (State 3) im Verhältnis zur State 2-Atmung des Komplex I. Erneut wurde Cytochrom c mit 5µl (10 mM) substituiert. Somit stellte sich nun ein State 3c ein, bei dem eine maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion bei Elektronenfluss über Komplex I nach Ausgleich eventueller Cytochrom c-Verluste herrscht. Den Effekt des Cytochroms c auf die Atmung geben die State 3c-Atmung, die Cytochrom c Control Ratio und die RCR des Komplex I unter Cytochrom c wieder. Die Cytochrom c Control Ratio berechnet sich aus dem Quotienten aus der Atmung unter Cytochrom c und der ADP-angeregten Atmungsaktivität, es wird also der State 3c des Komplex I zum State 3 des Komplex I ins Verhältnis gesetzt. Damit verdeutlicht sie die Steigerung des O_2-Verbrauchs durch die Cytochrom c-Applikation und stellt unter der Annahme des Cytochrom c-Tests einen wesentlichen Parameter zur Beurteilung der Intergrität der mitochondrialen Membran dar. Die RCR des Komplex I unter Cytochrom c berechnet nun die Relation des State 3c des Komplex I zum State 2 des Kompelx I. Im Anschluss wurde der Komplex I mit Rotenon (5 µl; 0,5 µM) inhibiert, um anschließend den Komplex II mit Succinat (20µl; 10 mM) isoliert vom Komplex I anzuregen. Das Pendant dieser Werte im Ergebnisteil stellt die Atmung des Komplexes II unter Cytochrom c dar. Sie beschreibt die Atmung des isolierten Komplex II in Anwesenheit von Cytochrom c als Voraussetzung für die ideale Funktion der COX. Um auch hier eine maximale ATP-Produktion mit Elektroneninput nur über den Komplex II hervorzurufen, wurden noch einmal 8 µl (2 mM) ADP gegeben, um sicherzustellen, dass hiervon noch ausreichende Mengen zur Verfügung stehen. Nachdem sich ein Plateau eingestellt hatte, wurde zur Gewinnung der Daten der Hintergrundprozesse Antimycin A (2 µl; 5µM) gegeben. Abschließend wurden zur Stimulation der COX Ascorbat (5 µl; 2 mM) und TMPD (5 µl; 0,5 mM) gegeben, da jedoch auf eine Hemmung der

Tab. 6: Übersicht über die States der Messungen bei 30 °C im Oxygraphen

ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; c: Cytochrom c; ca.: circa; CI-CIV: Komplex I-IV; ETS: Electron Transport System; O_2: Sauerstoff; RCR: Respiratory Control Ratio; TMPD: Tetramethyl-p-phenylendiamin.

Substrat	**Funktion**	**State**	**Parameter**
Malat **Glutamat**	Stimulation CI	2	● State 2-Atmung Komplex I
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
ADP	Maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion bei Elektronenfluss über CI	3	● State 3 Komplex I ● RCR Komplex I unter ADP
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
Cytochrom c	Substitution eventueller Cytochrom c-Verluste durch Membranschäden bei Präparation	3c	● State 3c-Atmung ● Cytochrom c Control Ratio ● RCR des Komplex I unter Cytochrom c
	Plateau ca. 5-10 Minuten abwarten		
Rotenon	Hemmung CI	-	
	Plateau ca. 20 Minuten abwarten		
	Reoxygenieren		
	Plateau ca. 5-10 Minuten abwarten		
Succinat	Stimualtion CII →maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion bei Elektronenfluss über CII	3c	● Atmung des CII unter Cytochrom c
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
ADP	Aufsättigung des ADPs im Messmediums	3c	
	Plateau ca. 10 Minuten abwarten		
Antimycin A	Hemmung CIII → kein Elektronenfluss mehr über das ETS möglich → Bestimmung des O_2-Verbrauchs durch Hintergrundprozesse		
	Plateau ca. 5 Minuten abwarten		
	Reoxygenieren		
	Plateau ca. 15 Minuten abwarten		
Ascorbat **TMPD**	Regeneration des TMPD Artifizieller Elektronendonator für CIV		
	Plateau ca. 5 Minuten abwarten		

COX mit KCN verzichtet wurde, war eine Berechnung der Atmung des Komplex IV nicht möglich, sodass dieser Teil des Protokolls lediglich der Vollständigkeit halber aufgeführt wird. Im Ergebnisteil werden die Parameter mit den entsprechenden für die OP-Mäuse gewonnenen Werten verglichen, um den Einfluss der in vitro-Temperatur auf die mitochondriale Atmung zu untersuchen. Tab. 6 gibt einen Überblick über das Protokoll.

2.6.5. Asservierung der Messproben und Wartung des OXYGRAPH-2k

Nach Beendigung des Experiments durch Anhalten der Rührer und Trennung des Geräts von DatLab 4 wurde in jede Kammer 2 ml MiR05 gegeben und die Suspension einer jeden Kammer auf drei Röhrchen verteilt. Diese Proben wurden nun zur Asservierung in reinem Stickstoff schock-gefrostet und bei -80 °C tiefgefroren. Die Kammern des OXYGRAPH-2k wurden zur Reinigung von fettlöslichen Substanzen (z.B. Rotenon, Oligomycin und Antimycin A) mit Ethanol (70%; Apotheke Universitätsklinikum Ulm) gespült und dann bis zur Hälfte mit Alkohol gefüllt. Die Stopfen wurden mit Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt und bis auf ca. 1 cm ihres Halses in die Kammern gedrückt. Zu guter Letzt wurde der Trichter der Pfropfen mit Ethanol angefüllt und die zwei Schutzkappen aus Perspex auf die Vertiefungen gelegt. Wenn im Anschluss noch eine weitere Messung stattfinden sollte, wurden die Kammern fünf Mal mit Ethanol und fünf Mal mit destilliertem Wasser gespült, die Stopfen gesäubert, erneut jeweils 2 ml MiR05 eingegossen und der Kalibrierungsvorgang gestartet. Durch die Einhaltung des Reinigungsprozesses wird zum einen eine hohe experimentelle Reliabilität der Messungen erreicht und zum anderen kann durch die Lagerung des POS in Ethanol seine Funktionalität selbst über Wochen hinweg aufrechterhalten werden [Gnaiger 2001-2009].

2.7. Datenverarbeitung und Statistik

Zur Dokumentation und Erstellung der deskriptiven Statistik wurde das Programm Microsoft Office Excel 2003 verwendet. Für die drei Versuchsgruppen wurden die Mediane, die Minimal- und Maximalwerte sowie das 1. und 3. Quartil (entspricht dem 25%- und dem 75%-Quantil) ermittelt und in Form von Abbildungen oder im Text genannten Werten ausgedrückt. Als Graphen zur Darstellung der Ergebnisse wurden Box- and Whiskers-Plots herangezogen, die mit Hilfe des Programms Sigma Plot für Windows Version 10.0 angefertigt wurden. Dabei steht der Querbalken in der Mitte der Boxen für den Median, während die untere Begrenzung der Box die 1. Quartile und die obere Begrenzung die 3. Quartile angibt. Die berechneten Minima zeigt jeweils der untere Whisker, die Maxima der

obere Whisker. Die statistische Auswertung wurde unter Einsatz des Programms Sigma Stat für Windows Version 3.1 vorgenommen. Bei den Permeabilitätsmessungen wurde zur Bestimmung einer signifikanten Reaktion auf die Gabe eines einzelnen Substrats hin innerhalb der Gruppe ein Wilcoxon-Rangtest durchgeführt. Der Vergleich der beiden Versuchsgruppen der Temperaturexperimente erfolgte mittels Mann-Whitney-Rangsummentests (U-Test). Im Falle der Untersuchungen bei unterschiedlichen Temperaturen im OXYGRAPH-2k wurden die drei Gruppen einander durch die Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance (ANOVA) on Ranks mit nachfolgendem Dunn´s Test gegenübergestellt. Das Signifikanzniveau α (Alpha) wurde jeweils auf $\alpha = 0{,}05$ gewählt. Der p-Wert benennt die Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3 Ergebnisse

Zum besseren Verständnis sind im Ergebnisteil bei den Permeabilitätsmessungen und bei der Untersuchung der Temperatureffekte Ausschnitte wichtiger Protokollschritte der Bildschirmansichten von DatLab 4 abgebildet. Da sich die Messungen bei 30 °C im OXYGRAPH-2k vom Protokoll her nur gering von den Messungen der Temperatureffekte unterschieden, wurde hier auf eine solche Darstellung verzichtet.

3.1. Permeabilitätsmessungen

Zur Untersuchung der mechanischen Permeabillisierung dienten sieben Mäuse, deren Gewebeproben mithilfe eines speziellen Messprotokolls mit Digitonin bearbeitet wurden. Abb. 5 zeigt den Bildschirmausschnitt bei einer Permeabilitätsmessung. Der blaue Graph

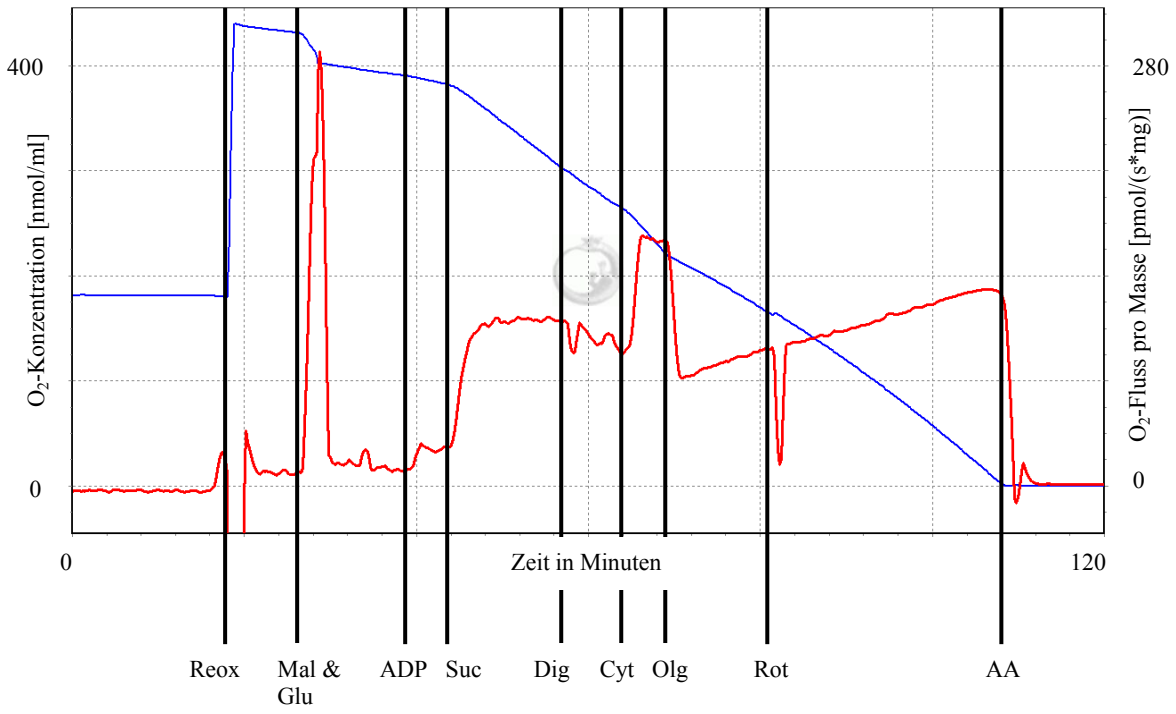

Abb. 5: Bildschirmdarstellung einer Permeabilitätsmessung im Programm DatLab 4

Blauer Graph: O_2-Konzentration in nmol/ml (Nanomol pro Milliliter); roter Graph: O_2-Fluss pro Masse in pmol/(s*mg) (Picomol pro Sekunde und Milligramm). Schwarze Längsbalken: Zeitpunkt der Gabe eines Substrats. AA: Antimycin A; ADP: Adenosindiphosphat; Cyt: Cytochrom c; Dig: Digitonin; Glu: Glutamat; Mal: Malat; O_2: Sauerstoff; Olg: Oligomycin; Reox: Reoxygenierung; Rot: Rotenon; Suc: Succinat. &: und.

steht für die O_2-Konzentration in nmol/ml, während der rote Graph die Atmungsaktivität in pmol/(s*mg) angibt. Vor Beginn des Protokolls wurde der O_2-Gehalt in den Kammern an-

gehoben (Reox: Reoxygenierung). Als Substrat für den Komplex I wurden Malat und Glutamat gegeben (Mal & Glu), woraufhin sich ein State 2 einstellte. Zur Initiierung des State 3 wurde ADP hinzugefügt. Die Stimulation von Komplex II erfolgte nach Gabe von Succinat (Suc); nun bestand ein State 3 mit synchronem Elektronenfluss über die Komplexe I und II. Um die Permeabilität der Gewebeproben zu testen, wurde jetzt Digitonin (Dig) injiziert. Wie man am roten Graphen erkennen kann, kam es nicht zu einem Anstieg der Atmung, das heißt, in diesem Fall ließ sich die Atmungsaktivität durch Digitonin nicht steigern. Etwaige Verluste an Cytochrom c wurden durch Substitution (Cyt) ausgeglichen. Durch den Einfluss von Oligomycin (Olg) stellte sich ein State 4 ein. Zur Hemmung der Komplexe I bzw. III wurden Rotenon (Rot) und Antimycin A (AA) gegeben. In Abb. 6 ist die Atmung vor Gabe von Digitonin (= Succinat-stimulierte Atmung) im Vergleich zur Atmung nach Gabe von Digitonin dargestellt. Der Wilcoxon-Rangtest zeigte, dass der p-Wert von 0,078 das festgelegte Signifikanzniveau (< 0,05) überragt. Die Atmung steigt also nicht signifikant an.

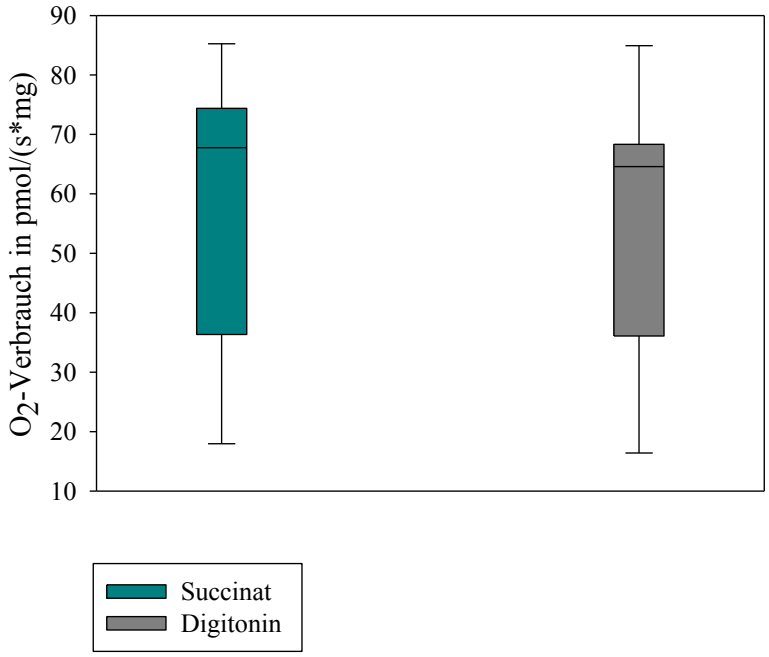

Abb. 6: Vergleich der Atmung vor (Succinat) und nach der Gabe von Digitonin

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm; O_2: Sauerstoff.

3.2. Untersuchung der Temperatureffekte

3.2.1. State 2-Atmung

Abb. 7 gibt die DatLab 4-Bildschirmansicht der Messung wieder, Abb. 8 die gemessene State 2-Atmung. In Abb. 7 ist ein Messzeitraum von 40 Minuten dargestellt. Vor der Applikation von Substraten wurde die O_2-Konzentration durch Injektion von O_2 erhöht. Malat und Glutamat wurden zur Stimulation des Komplex I gleichzeitig gegeben, woraufhin ein leichter Anstieg der Atmungsaktivität zu verzeichnen war. Bei der kurz darauf erfolgten Applikation von Succinat für Komplex II kam es zu einem noch stärkeren Anstieg der Atmung, da die Elektronen bei der State 2-Atmung nun parallel über die Komplexe I und II in die Atmungskette einfloßen. Durch das Hinzufügen von ADP wurde die State 3-Atmung, also eine maximale gekoppelte Atmung mit ATP-Produktion über die Komplexe

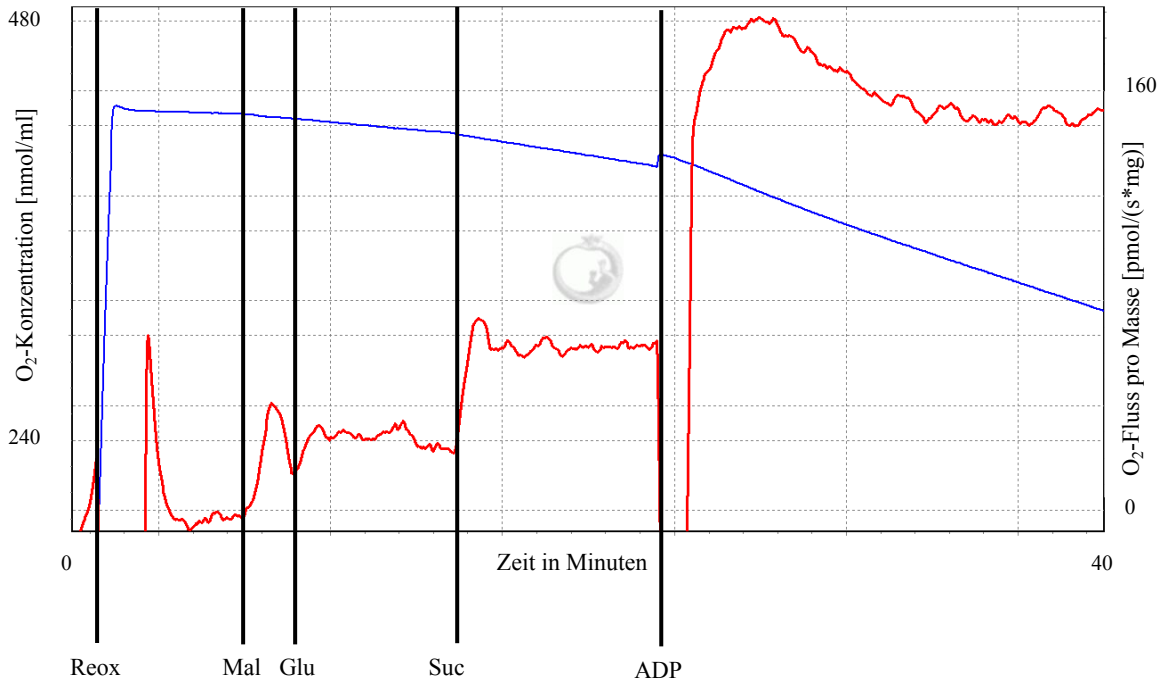

Abb. 7: Bildschirmdarstellung State 2-Atmung

Blauer Graph: O_2-Konzentration in nmol/ml (Nanomol pro Milliliter); roter Graph: O_2-Fluss pro Masse in pmol/(s*mg) (Picomol pro Sekunde und Milligramm). ADP: Adenosintriphosphat; Glu: Glutamat; Mal: Malat; O_2: Sauerstoff; Reox: Reoxygenierung; Suc: Succinat.

I und II, initiiert. Bei der Gabe der Substrate kommt es kurz zu starken Ausschlägen in beiden Graphen, die das Korrelat zu den temporären Irritationen des POS durch die Injektionen darstellen. Die State 2-Atmung veranschaulicht Abb. 8. Der Mann-Whitney-Rangsummentests bewies, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab, da der p-Wert von 0,442 das Signifikanzniveau von 0,05 deutlich überschritt.

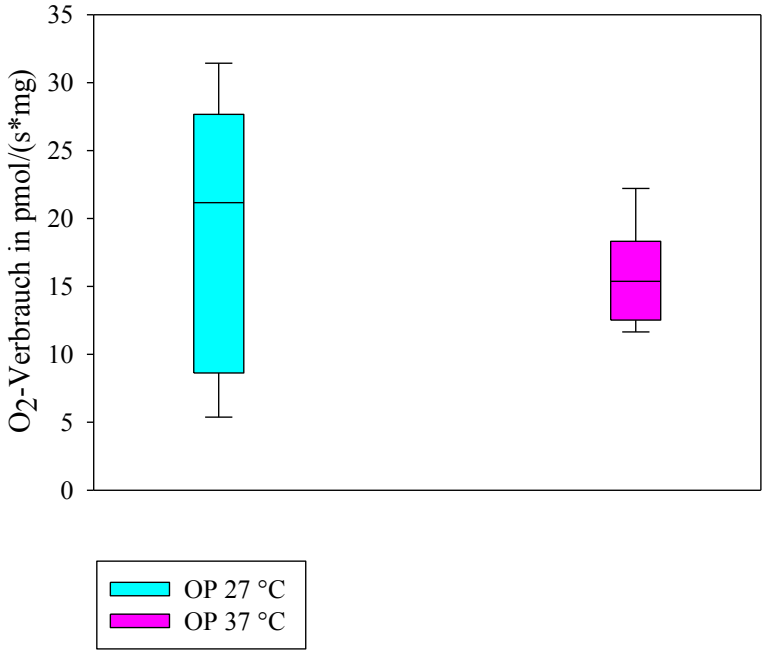

Abb. 8: Vergleich der State 2-Atmung bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm.

3.2.2. State 2-Atmung im Vergleich zur entkoppelten Atmung

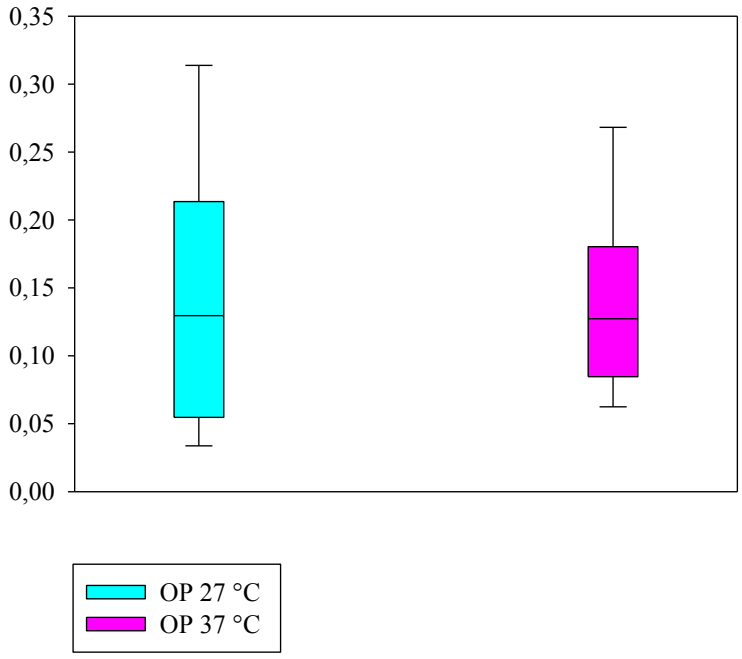

Abb. 9: State 2-Atmung im Vergleich zur entkoppelten Atmung bei OP 27 °C- und OP 37 °C –Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation.

Abb. 9 gibt die Atmung nach Gabe von Malat, Glutamat und Succinat in Relation zur Atmung nach Gabe von FCCP an. Bei der Überprüfung mittels U-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (ein p-Wert <0,05 galt als signifikant, der ermittelte Wert von 0,959 lag darüber).

3.2.3. State 3-Atmung

Abb. 10 zeigt wieder die Bildschirmansicht von DatLab 4, Abb. 11 veranschaulicht die Werte nach Gabe von ADP. Dieser Ausschnitt beginnt mit dem Erreichen der gemeinsamen State 3-Atmung der Komplexe I und II nach Zugabe von ADP. Um nun etwaige Verluste an Cytochrom c auszugleichen, wurde dieses substituiert (Cyt). Hierunter stellt sich ein rascher Anstieg der Atmung ein. Durch das Injizieren von Oligomycin (Olg) in die Kammern erreicht die Messung nun den State 4. Da es zu einem starken O_2-Verbrauch gekommen ist, wird die O_2-Konzentration nun durch die Applikation von O_2 angehoben (Reox; Reoxygenierung). Durch die Injektionen entstehen jeweils bei beiden Graphen Artefakte, da das Signal des POS kurzzeitig gestört wird (starke Ausschläge der Graphen).

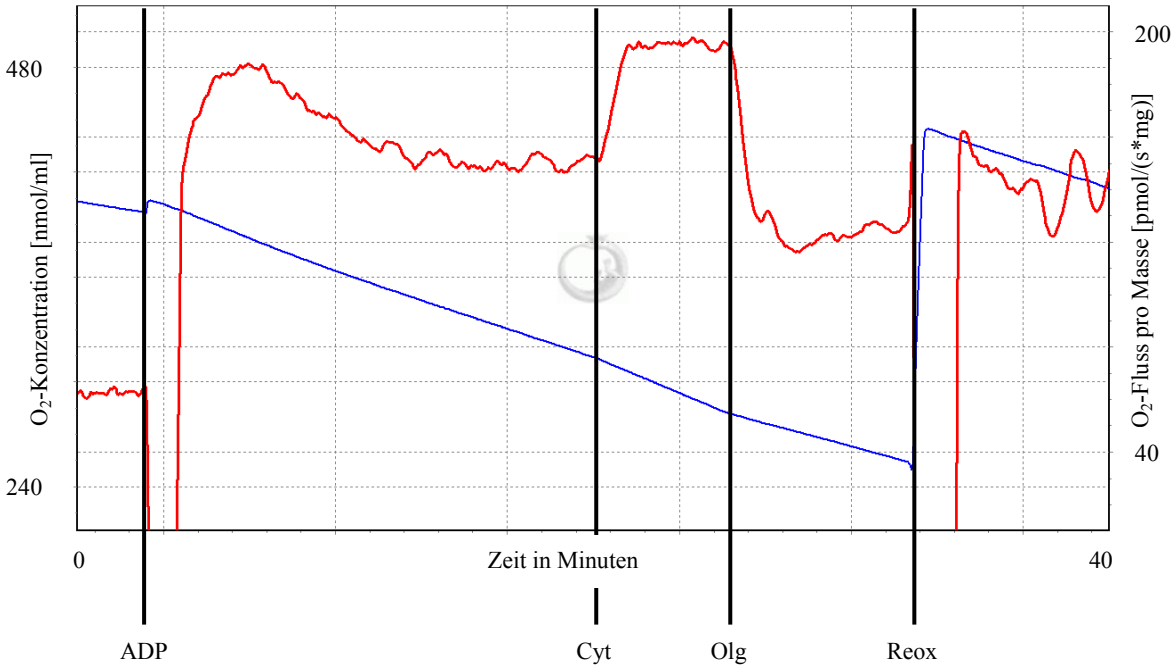

Abb. 10: Bildschirmdarstellung State 3-, State 3c- und State 4-Atmung

Blauer Graph: O_2-Konzentration in nmol/ml (Nanomol pro Milliliter); roter Graph: O_2-Fluss pro Masse in pmol/(s*mg) (Picomol pro Sekunde und Milligramm). ADP: Adenosintriphosphat; Cyt: Cytochrom c; O_2: Sauerstoff; Olg: Oligomycin; Reox: Reoxygenierung.

Die Komplexe I und II können nun dank Aufhebung der Hemmung durch ADP-Mangel im State 3 ihre maximale physiologische Leistung unter ATP-Produktion erbringen. Der zum Vergleich benutzte Mann-Whitney-Rangsummentest ergab bei einem Signifikanzniveau von <0,05 nur sehr knapp keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, da der p-Wert in diesem Fall genau bei 0,05 lag.

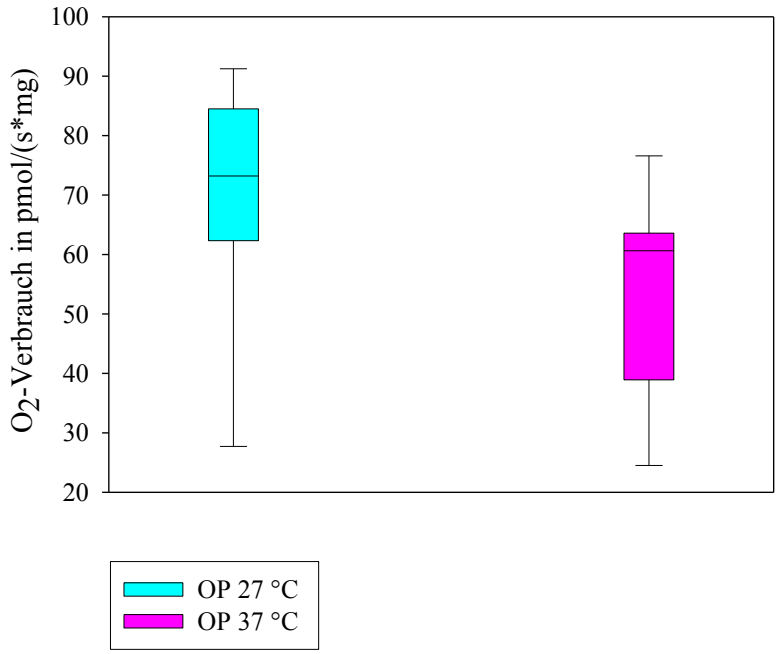

Abb. 11: Vergleich der gekoppelten Atmung mit ATP-Synthese nach ADP-Gabe bei OP 27 °C- und OP-37 °C Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; °C: Grad Celsius; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm.

3.2.4. RCR (Respiratory Control Ratio) von Komplex I und II unter ADP

Abb. 12 zeigt die nach Gabe von ADP gewonnenen Werte der RCR (Respiratory Control Ratio) von Komplex I und II. Diese ist der Quotient aus der maximalen gekoppelten Atmung nach ADP-Gabe und der State 2-Atmung nach Malat, Glutamat und Succinat, also das Verhältnis von State 3 zu State 2. Auch bei der RCR von Komplex I und II zeigte sich im Mann-Whitney-Rangsummentest bei einem p-Wert von 0,05 kein bedeutungsvoller Unterschied (der p-Wert betrug 0,959).

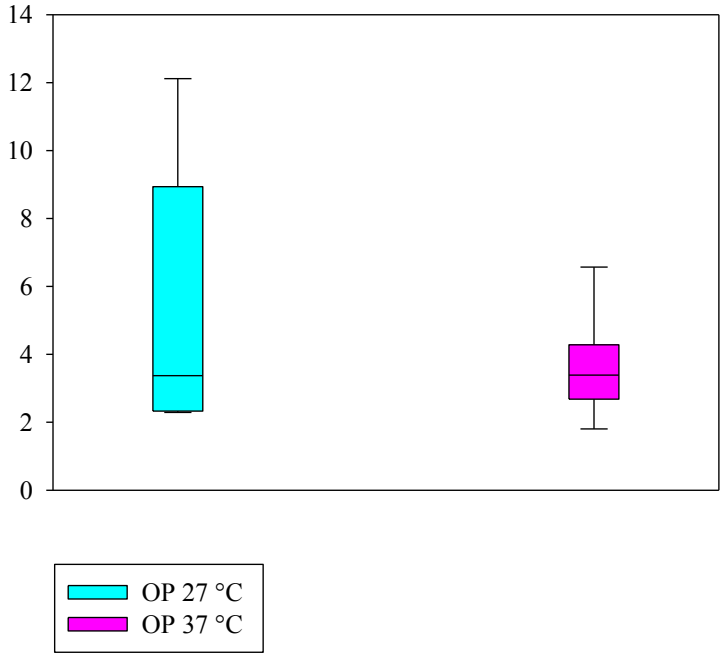

Abb. 12: Vergleich der RCR von Komplex I und II bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation; RCR: Respiratory Control Ratio.

3.2.5. Vergleich der CI+CII Ratio (Complex I und Complex II Ratio) unter ADP von kalten und warmen Mäusen

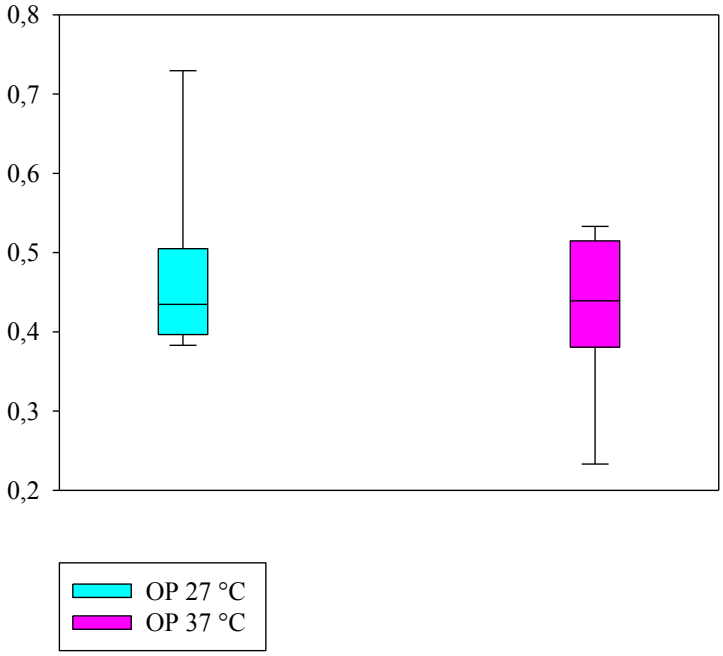

Abb. 13: Vergleich der CI+CII Ratio unter ADP bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplots, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. ADP: Adenosindiphosphat; °C: Grad Celsius; CI+CII: Komplex I+II; OP: Operation.

Die „CI+CII Ratio“ beschreibt die Atmung der Komplexe I und II (gemessen nach ADP) bezogen auf die Atmung nach FCCP-Gabe (Abb. 13). Beim statistischen Vergleich der beiden Gruppen mittels U-Test (Signifikanz ab Werten <0,05) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (p-Wert = 0,959).

3.2.6. State 3c- Atmung

Abb. 14 gibt die Reaktion der Atmung auf das Hinzufügen von Cytochrom c bei OP 27 °C und OP 37 °C Mäusen wieder. Innerhalb beider Gruppen wurde der Anstieg der Atmung nach Cytochrom c-Gabe im Vergleich zur State 3-Atmung nach ADP mittels eines Wilcoxon-Rangtest für zwei verbundene Stichproben überprüft. Dabei erhielt man bei einem angenommenen Signifikanzniveau von <0,05 das Ergebnis, dass sowohl bei den OP 27 °C (p-Wert = 0,016) als auch bei den OP 37 °C Mäusen (p-Wert = 0,008) die Atmungsaktivität durch das Hinzufügen von Cytochrom c signifikant gesteigert wurde.

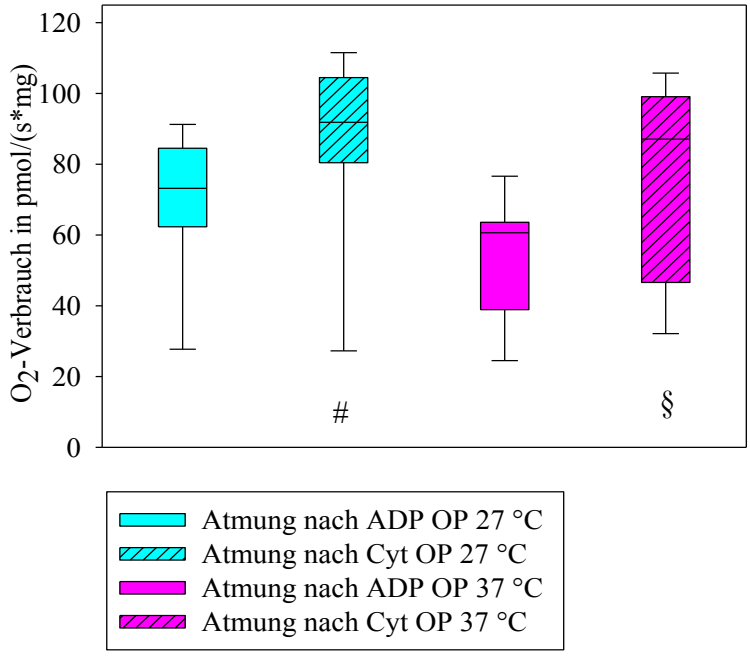

Abb. 14: Vergleich des Anstiegs der Atmung nach Cytochrom c-Gabe bei OP 27 °C- und OP 37 °C- Mäusen
Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. #: Signifikanz zur Atmung nach ADP OP 27°C, p-Wert < 0,05. §: Signifikanz zur Atmung nach ADP OP 37

°C, p-Wert <0,05. ADP: Adenosindiphosphat; °C: Grad Celsius; Cyt: Cytochrom c; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm.

3.2.7. Cytochrom c Control Ratio

Die Cytochrom c Control Ratio (Abb. 15) beschreibt den Anstieg der Atmung nach Gabe von Cytochrom c (State 3c) im Verhältnis zur Atmung nach ADP (State 3). Im Mann-Whitney-Rangsummentest ergab sich bei einem Signifikanzniveau von <0,05 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen OP 27 °C und OP 37 °C Mäusen mit einem p-Wert von 0,038. Das bedeutet, die Cytochrom c Control Ratio der OP 37 °C Tiere liegt erheblich über der der OP 27 °C Tiere.

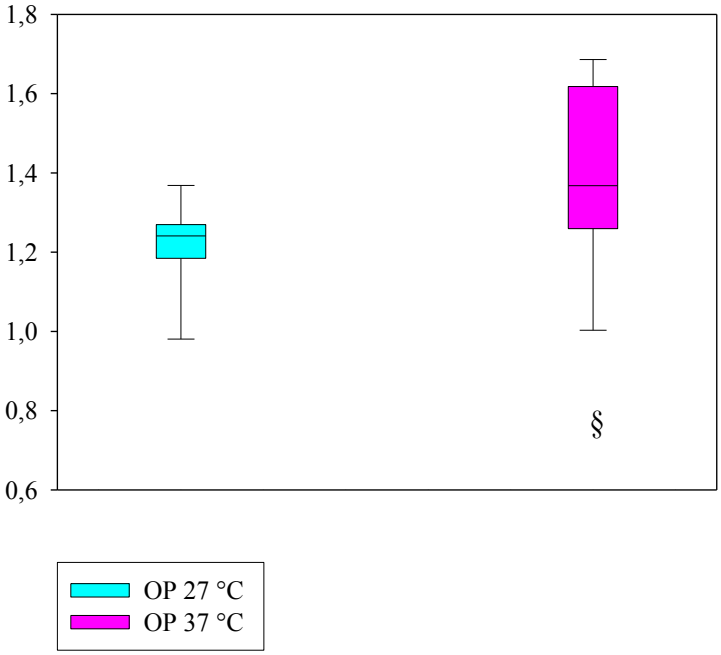

Abb. 15: Vergleich der Cytochrom c Control Ratio bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. §: Signifikanz zur Cytochrom c Control Ratio OP 27 °C, p-Wert <0,05. °C: Grad Celsius; OP: Operation; p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.2.8. Cytochrom c Ratio

Die Cytochrom c Ratio stellt – analog zur CI+II Ratio der Komplexe I und II – die State 3c-Atmung nach Gabe von Cytochrom c verglichen mit der Aktivität des ETS nach Entkopplung mit FCCP dar. Abb. 16 zeigt die Werte für beide Gruppen. Hier ergab sich beim U-Test nach Mann-Whitney (Signifikanz ab einem p-Wert <0,05) kein statistisch

signifikanter Unterschied zwischen den OP 27 °C- und den OP 37 °C-Tieren (p-Wert = 0,382).

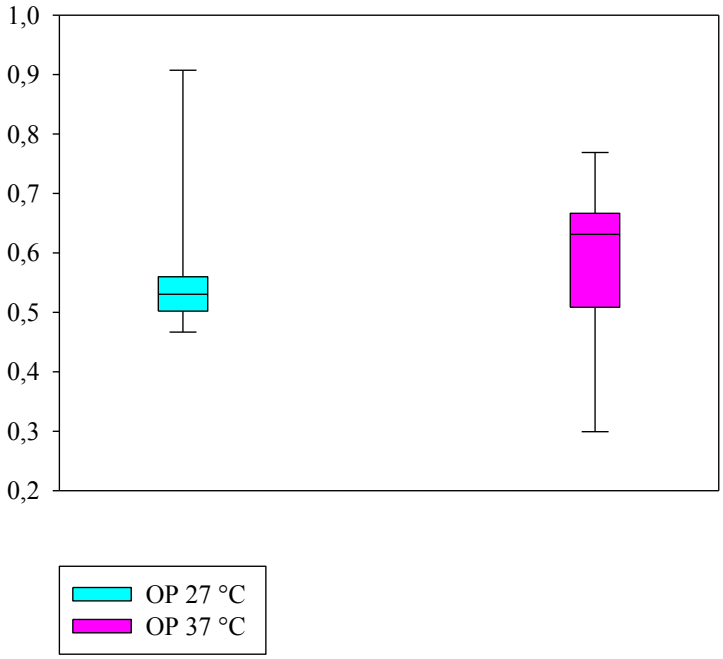

Abb. 16: Vergleich der Cytochrom c Ratio bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation.

3.2.9. RCR (Respiratory Control Ratio) von Komplex I und II unter Cytochrom c

Die in Abb. 17 abgebildete RCR von Komplex I und II unter Cytochrom c veranschaulicht die Steigerung der Atmungsaktivität nach Verabreichung von Cytochrom c (State 3c) im Verhältnis zur State 2-Atmung nach Malat, Glutamat und Succinat. Mithilfe des U-Tests mit einem Signifikanzniveau von <0,05 wurde die RCR von Komplex I und II auf einen statistisch signifikanten Unterschied hin überprüft. Dieser konnte einen solchen zwischen den beiden Kollektiven nicht feststellen (p-Wert = 0,959).

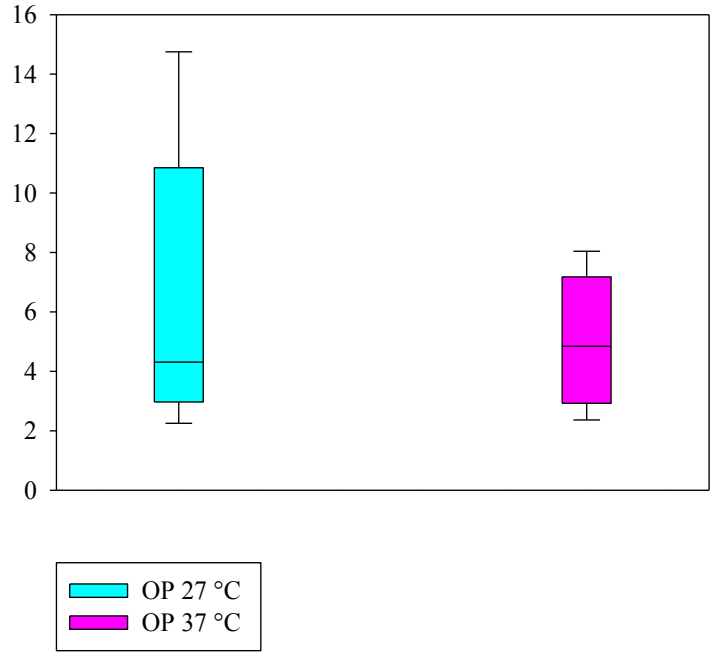

Abb. 17: Vergleich der RCR von Komplex I und II unter Cytochrom c bei OP 27 °C- und OP 37 °C- Mäusen
Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation; RCR: Respiratory Control Ratio.

3.2.10. State 4-Atmung und Leak Respiratory

Die State 4-Atmung nach Gabe von Oligomycin wird in Abb. 18 wiedergegeben. Zum Vergleich dieser Atmung bei OP 27 bzw. 37 °C-Mäusen wurde der Rangsummentest nach Mann-Whitney (Signifikanz ab p-Wert <0,05) herangezogen. Dieser bewies, dass bei einem p-Wert = 1,00 kein Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt. Die Leak Respiratory setzt die State 4-Atmung ins Verhältnis zur State 3c-Atmung unter Cytochrom c (Abb. 19). Die statistische Überprüfung mittels U-Test bei einem Signifikanzniveau von <0,05 ergab keine bedeutsame Differenz zwischen den Kollektiven (p-Wert = 0,382).

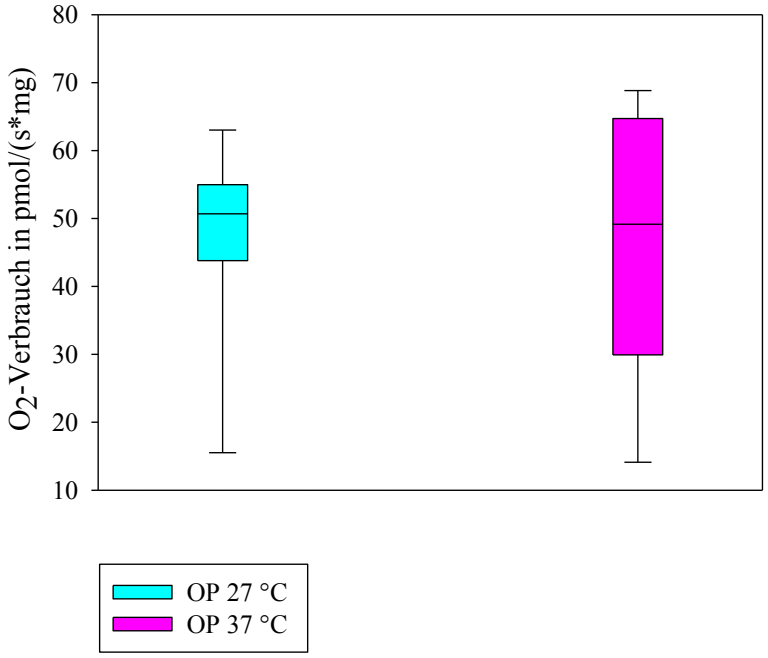

Abb. 18: Vergleich der State 4-Atmung bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm.

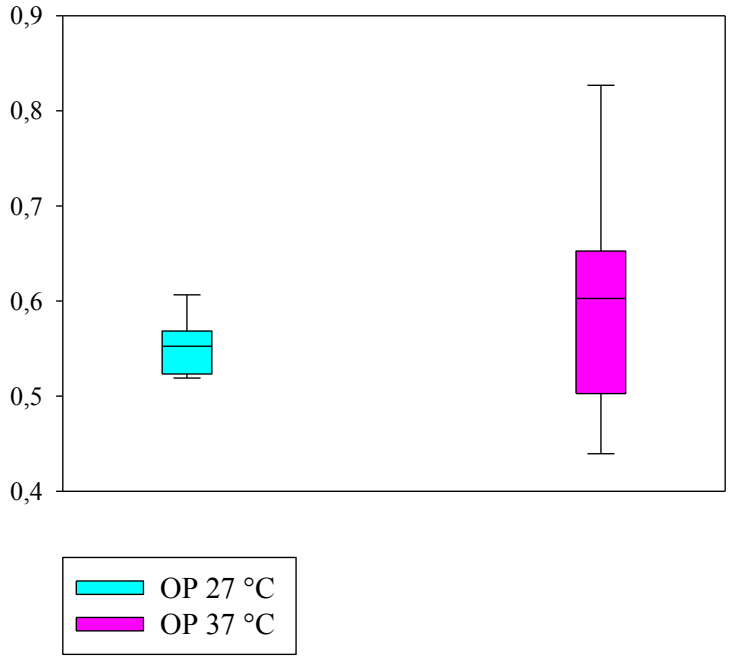

Abb. 19: Vergleich der Leak Respiratory bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation.

3.2.11. Atmung nach Entkopplung mit FCCP

In Abb. 20 ist die Bildschirmansicht von DatLab 4 eingefügt. Diesmal liegt der Schwerpunkt auf den Titrierungsvorgängen bei Entkopplung. Man kann gut die schrittweise Gabe von FCCP in 1 µl-Portionen nachvollziehen, um eine Überdosierung und Hemmung der Atmungskette zu verhindern (grüne Balken). Nachdem die maximale Atmung erreicht war, wurde die Titrierung beendet, als sich eine beginnende Inhibition abzeichnete (siehe leichten Abfall der Atmung nach dem Scheitelpunkt der FCCP-Atmung). Aufgrund des starken O_2-Verbrauchs wurde sowohl vor als auch nach der Gabe von FCCP reoxygeniert, um einer Limitierung der Atmungt durch einen O_2-Mangel vorzubeugen. Die States 3 (ADP), 3c (Cyt: Cytochrom c) und 4 (Olg: Oligomycin) sind ebenfalls abgebildet. Abb. 21 stellt die Atmung nach Gabe von FCCP bei OP 27 °C- und OP 37 °C- Mäusen dar. Die Entkopplung des ETS von der ATP-Produktion ermöglicht es den Komplexen, ihr maximales Potential auszuschöpfen, daher eignet sich die nach FCCP gemessene Atmung ideal als Bezugswert für alle anderen durch Substrate hervorgerufenen Änderungen der At-

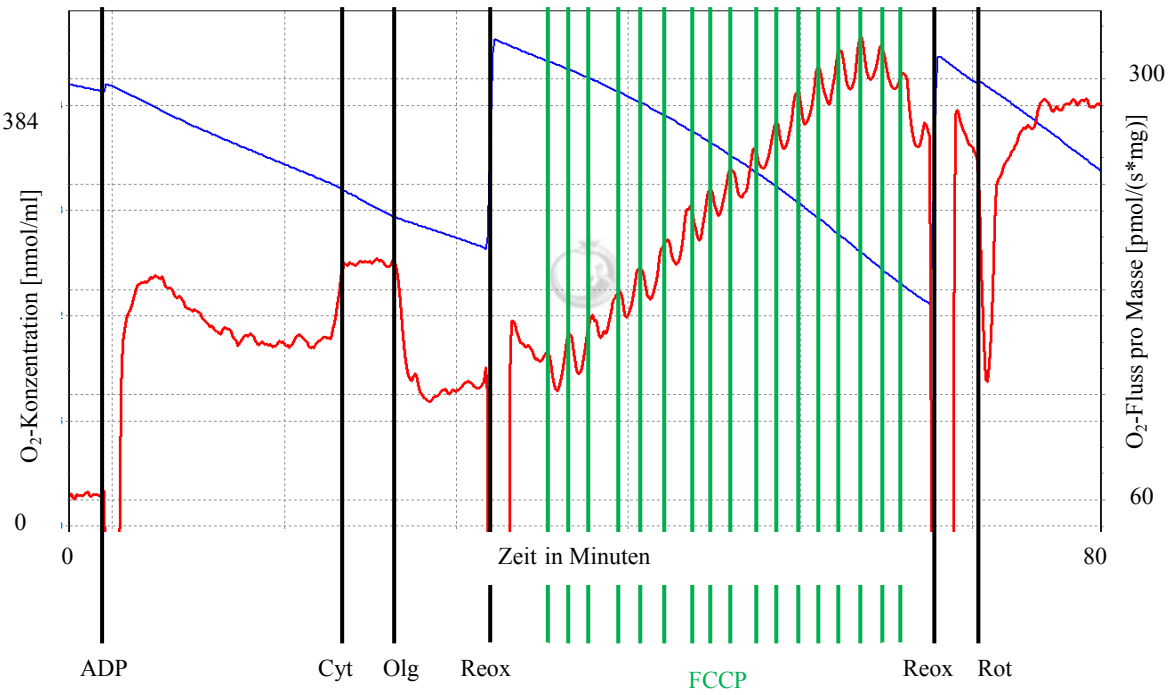

Abb. 20: Bildschirmdarstellung der Entkopplung mit FCCP

Blauer Graph: O_2-Konzentration in nmol/ml (Nanomol pro Milliliter); roter Graph: O_2-Fluss pro Masse in pmol/(s*mg) (Picomol pro Sekunde und Milligramm). ADP: Adenosindiphosphat; Cyt: Cytochrom c; FCCP (grün): Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; O_2: Sauerstoff; Olg: Oligomycin; Reox: Reoxygenierung; Rot: Rotenon.

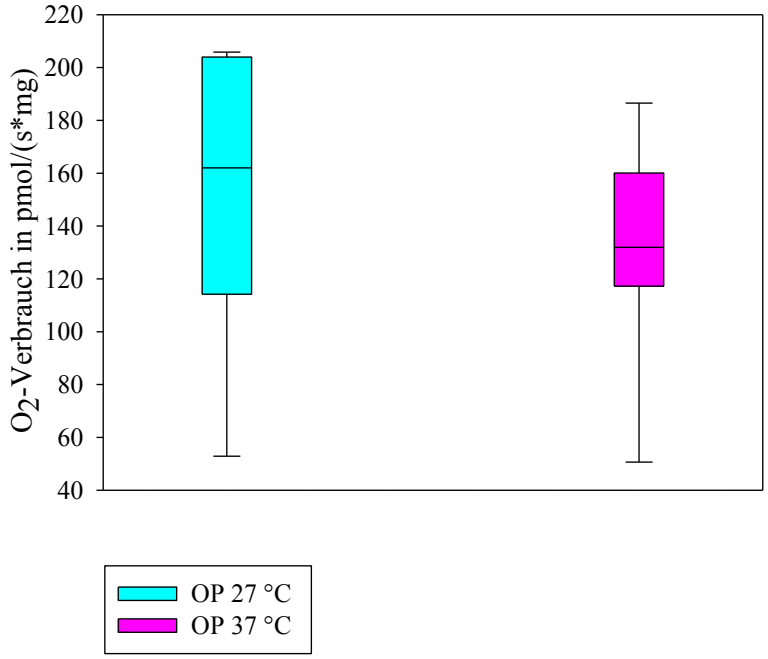

Abb. 21: Vergleich der Atmung nach Entkopplung mit FCCP bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen
Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm.

mungsaktivität. Der Mann-Whitney Rangsummentest mit einem Signifikanzniveau von <0,05 ergab einen p-Wert von 0,234. Das bedeutet, die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich ihrer gemessenen Aktivität der Atmungskette nicht.

3.2.12. RCR von FCCP

Die RCR von FCCP beschreibt den Anstieg der Atmung nach FCCP im Verhältnis zur Atmung nach Oligomycin (Abb. 22). Der Mann-Whitney-Rangsummentest (Signifikanz bei p-Werten <0,05) zum Vergleich der beiden Gruppen hatte mit p = 0,161 keinen ausreichend großen p-Wert zum Resultat, um von einem Unterschied zwischen den beiden Gruppen auszugehen.

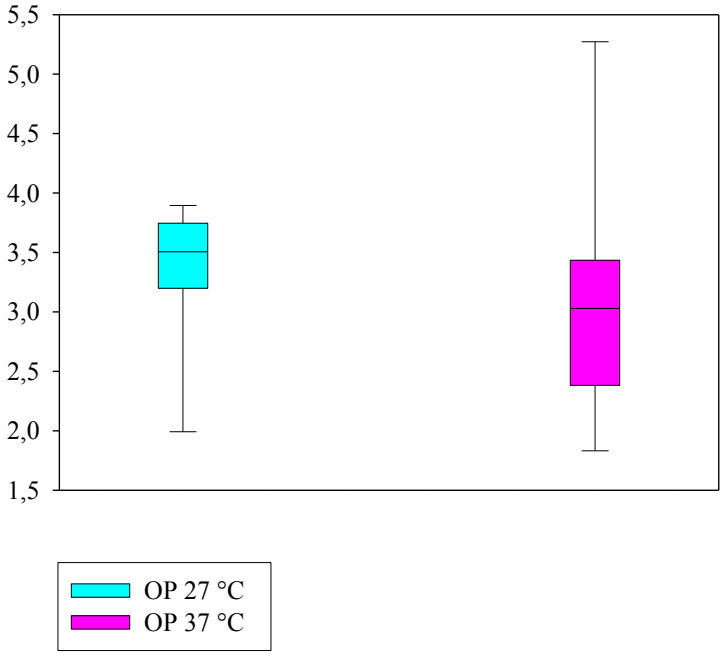

Abb. 22: Vergleich der RCR von FCCP bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; FCCP: Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; OP: Operation; RCR: Respiratory Control Ratio.

3.2.13. $UCR_{u/D}$ (Uncoupling Control Ratio)

Die $UCR_{u/D}$ ist ein Maß für die Entkopplung durch FCCP (dargestellt in Abb. 23). Sie zeigt, um welchen Faktor die maximale Kapazität des ETS (u) die gekoppelte, nicht von der ATP-Synthese gelöste Atmung nach ADP (D) übersteigt. Die $UCR_{u/D}$ von OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen wurde mittels Mann-Whitney-Rangsummentest (Signifikanz ab p-Wert <0,05) gegenübergestellt. Dieser ergab keine signifikanten Abweichungen zwischen den beiden Gruppen (p-Wert = 0,959).

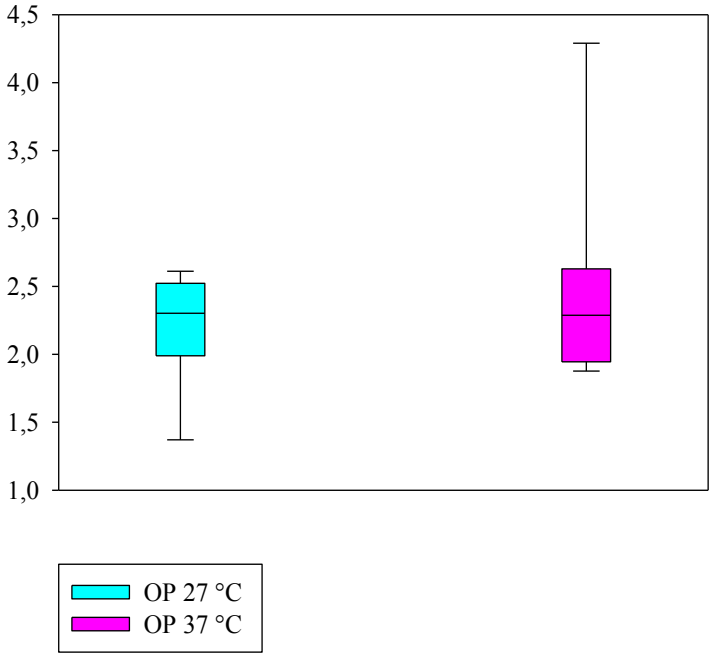

Abb. 23: Vergleich der $UCR_{u/D}$ bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation; $UCR_{u/D}$: Uncoupling Control Ratio, D: ADP (Adenosindiphosphat), u: uncoupling.

3.2.14. $UCR_{u/c}$ (Uncoupling Control Ratio)

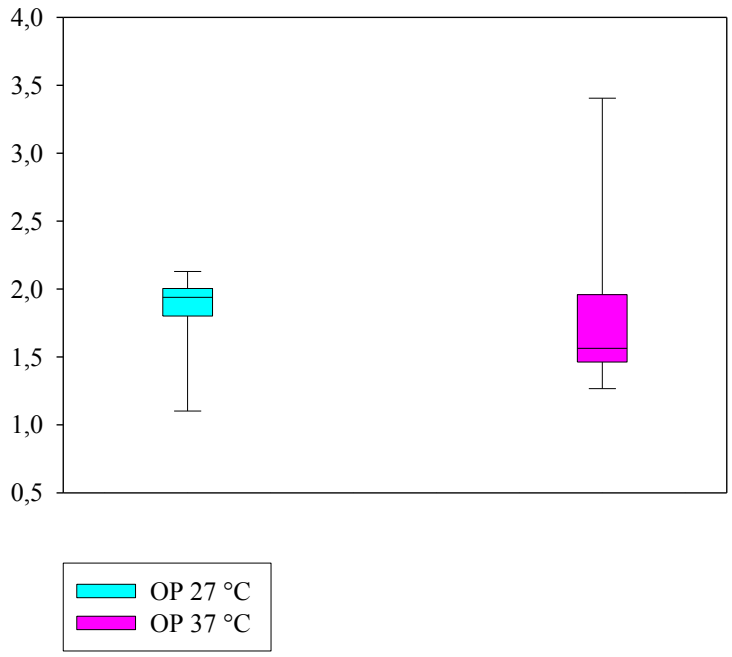

Abb. 24: Vergleich der $UCR_{u/c}$ bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation; $UCR_{u/c}$: Uncoupling Control Ratio, c: Cytochrom c, u: uncoupling.

Die $UCR_{u/c}$ gibt das Verhältnis der Atmung nach Entkopplung durch FCCP (u) zur Atmung nach Cytochrom c-Gabe (c) wieder (Abb. 24). Der vorgenommene U-Test nach Mann-Whitney ergab keinen statistisch bedeutsamen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p-Wert von 0,279 bei einem Signifikanzniveau von 0,05).

3.2.15. Atmung des Komplexes IV

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, erhält man die Atmung von Komplex IV, indem man von der Atmung nach TMPD und Ascorbat den O_2-Verbrauch nach Gabe von KCN abzieht, da dieser nach Hemmung des Komplexes IV mit KCN noch vorhandene Bedarf der Autooxidation von TMPD und Ascorbat entspricht. Die Berechnung der Aktivität des Komplexes IV sei nun an einer exemplarischen Kammer erklärt.

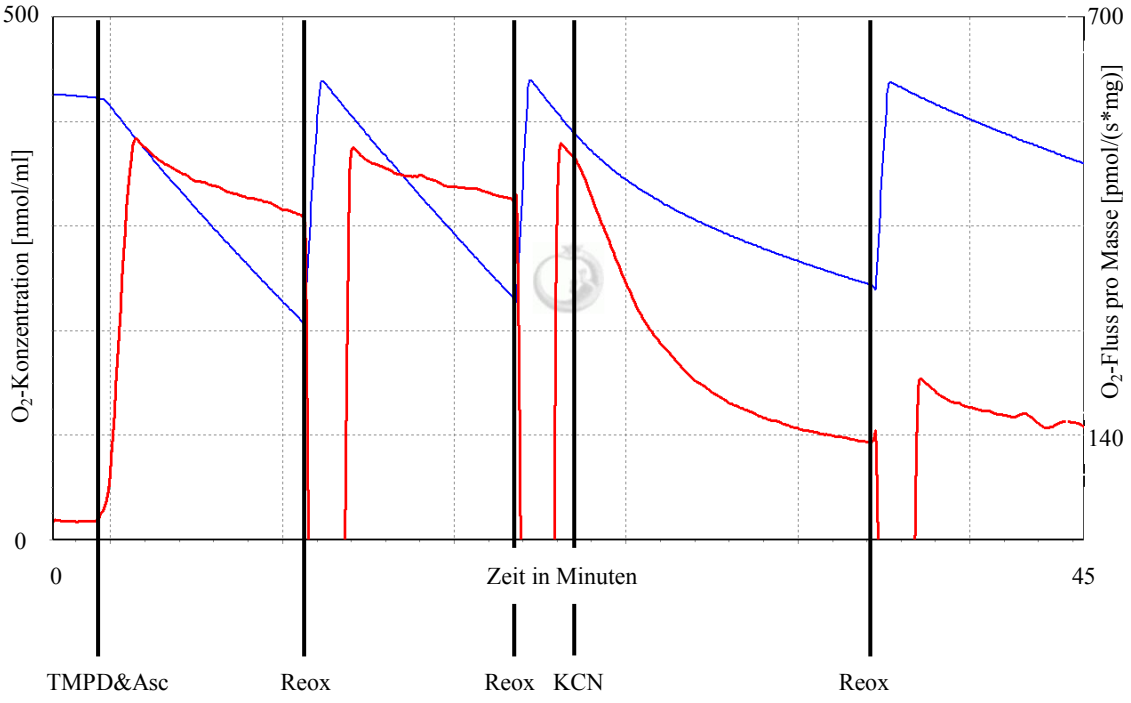

Abb. 25: Bildschirmdarstellung der Graphen von Sauerstoffkonzentration und -verbrauch unter TMPD/Asc und KCN

Blauer Graph: O_2-Konzentration in nmol/ml (Nanomol pro Milliliter); roter Graph: O_2-Fluss pro Masse in pmol/(s*mg) (Picomol pro Sekunde und Milligramm). Schwarze Längsbalken: Zeitpunkt der Gabe eines Substrats. Asc: Ascorbat; KCN: Kaliumcyanid; O_2: Sauerstoff; Reox: Reoxygenierung; TMPD: Tetramethyl-p-phenylendiamin. &: und.

Abb. 25 zeigt die Bildschirmansicht dieses Beispiels. Zur Berechnung fertigt man ein Diagramm, in dem die O_2-Konzentration gegenüber dem O_2-Verbrauch aufgetragen ist, an (siehe Abb. 26). In das Diagramm trägt man nun eine Gerade ein, die den O_2-Verbrauch durch die Autooxidation von TMPD nach Hemmung der COX mit KCN in Abhängigkeit von der O_2-Konzentration wiedergibt. Da die Auooxidation von TMPD vom O_2-Partialdruck abhängig ist, gibt es keinen konstanten Wert, um den man die gemessene Aktivität korrigieren kann, sondern der jeweilige Anteil der Autooxidation von TMPD am O_2-Verbrauch muss ausgehend von der O_2-Konzentration berechnet werden. Diese Gerade bildet nun sozusagen eine Null-Linie der Atmung des Komplex IV, da man die erhobenen Werte unter TMPD um den Betrag der Null-Linie am Zeitpunkt der jeweiligen O_2-Konzentration berichtigen muss. Zur Erstellung der Geraden liest man aus DatLab 4 die Angaben zur durchschnittlichen O_2-Konzentration und dem O_2-Verbrauch in den Intervallen nach Gabe von KCN ab. Da nach dem Verabreichen von KCN aufgrund des hohen O_2-Abfalls reoxygeniert werden musste, erhält man nun zwei Datenpunkte für das Diagramm, einen nach Gabe von KCN und einen für den Zeitpunkt nach der Reoxygenierung. Anhand dieser beiden Punkte wird nun eine Geradengleichung aufgestellt und die bestimmte Gerade wird in das Diagramm eingetragen. Nimmt man wie in unserem Beispiel die Werte 246,2247 nmol/ml und 131,9575 pmol/(s*mg) nach KCN-Gabe und 397,0169 nmol/ml und 173,3587 pmol/(s*mg) nach Reoxygenierung, so erhält man als lineare Funktion für den O_2-Verbrauch durch Autooxidation von TMPD in Abhängigkeit von der O_2-Konzentration die Gerade KCN: y = 0,2746*x+64,355 (blauer Graph in Abb. 30). Genauso verfährt man nun mit den nach Injektion von TMPD und Ascorbat erhaltenen Atmungsaktivitäten. Da auch hier ein starker Abfall der O_2-Konzentration durch TMPD auftrat, war ebenfalls eine Anhebung des O_2-Gehalts notwendig und es lagen wieder zwei Datenpunkte, einer nach TMPD und einer nach Reoxygenierung, vor. Basierend auf diesen Angaben (226,2015 nmol/ml und 441,9036 pmol/(s*mg) unter TMPD und 370,6825 nmol/ml und 499,2633 pmol/(s*mg) nach Reoxygenierung für unser Beispiel) wird nun eine weitere Geradengleichung aufgestellt, deren Graph nun die gemeinsame Atmungsaktivität der Autooxidation von TMPD sowie des Komplexes IV repräsentiert. Bei den hier gewählten Daten lautet sie y = 0,397*x+352,1 (lilafarbener Graph in Abb. 26). Anhand dieser beiden Geraden kann man nun bei jeder beliebigen O_2-Konzentration auf die jeweilige Aktivität der COX zurückrechnen, indem man in beide Geradengleichungen die interessierende O_2-Konzentration einsetzt und dann bei den erhaltenen Werten den Betrag der Autooxidation von TMPD (grüner Anteil der Atmungsaktivität in Abb. 26) von der gemeinsamen Atmungs-

aktivität von TMPD und Komplex IV abzieht. In unserem Beispiel zogen wir als O_2-Konzentration zur Berechnung der Aktivität der COX diejenige heran, die im Intervall nach Gabe von Cytochrom c gemessen wurde, da hier unter Substitution etwaiger Cytochrom c-Verluste die unter den gegebenen Bedingungen maximale physiologische Atmungskativität herrschte. Diese O_2-Konzentration lag bei 362,8538 nmol/ml, sodass sich nach Abzug der Auotooxidation von TMPD (163,994653 pmol/(s*mg); grüner Anteil der Atmung in Abb. 26) von der gemeinsamen Atmungsaktivität mit der COX (496,152959 pmol/(s*mg)) als Aktivität des Komplexes IV bei dieser O_2-Konzentration 332,158305 pmol/(s*mg) (türkis-

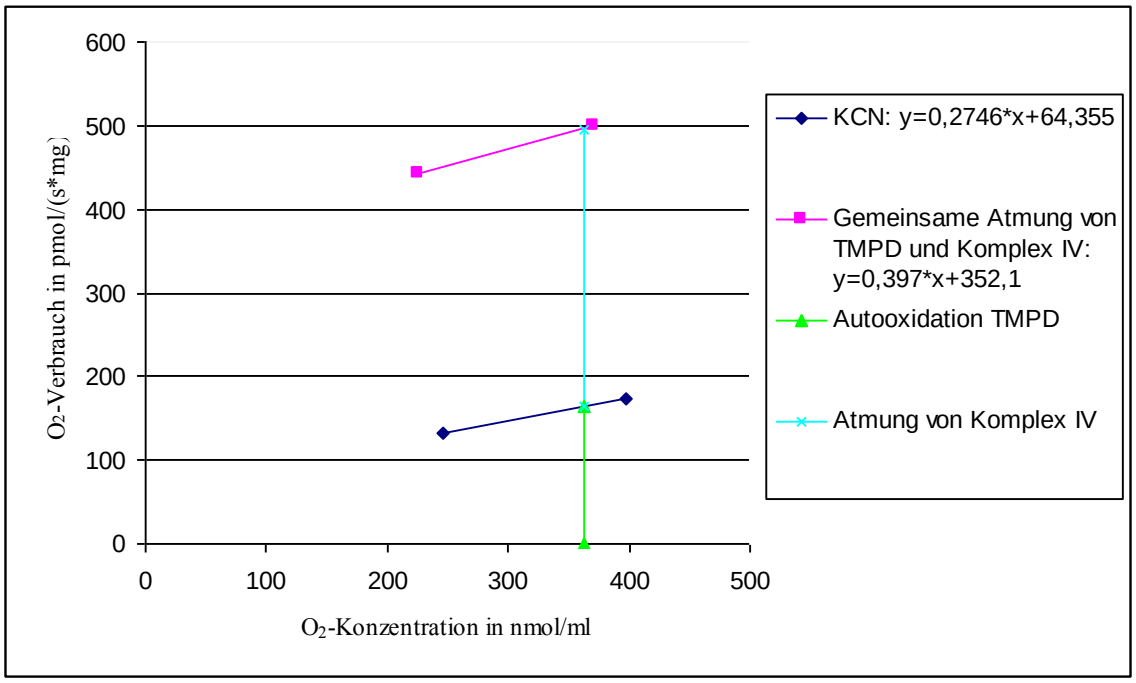

Abb. 26: Berechnung der Atmung von Komplex IV in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration
KCN: Kaliumcyanid; nmol/ml: Nanomol pro Milliliter; O_2: Sauerstoff; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm; TMPD: Tetramethyl-p-phenylendiamin; x: x-Achsenwert y: y-Achsenwert.

farbener Anteil des O_2-Verbrauchs) ergab. Auf dieselbe Weise wird auch mit der zweiten Kammer verfahren und anschließend der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet. Dieses Ergebnis wird nun bei den weiteren statistischen Auswertungen als Atmungsaktivität des Komplexes IV dieses Versuchstieres verwendet. In Abb. 27 sind die berechneten Atmungsaktivitäten der COX für die beiden Versuchgruppen dargestellt. Im Mann-Whitney-Rangsummentest (Signifikanzniveau von <0,05) zeigte sich mit einem p-Wert von 0,038 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

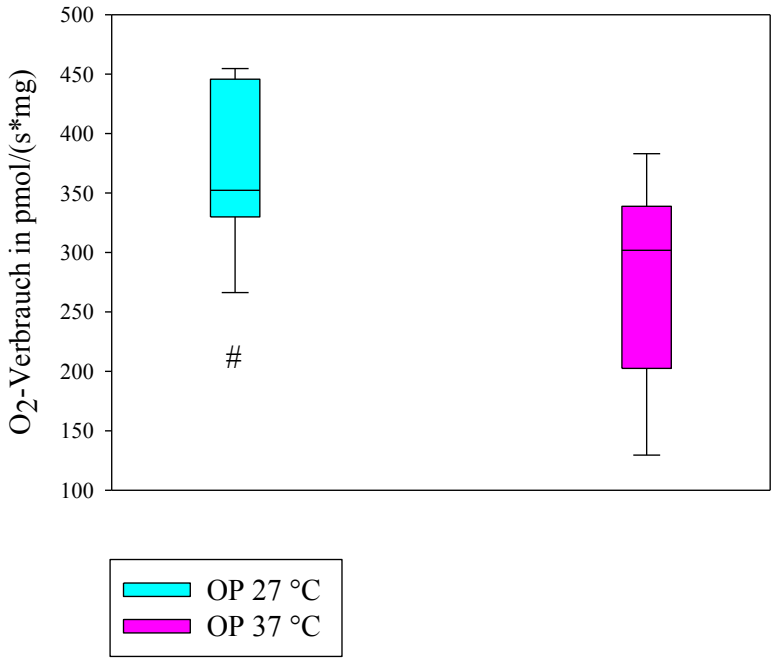

Abb. 27 : Vergleich der Atmung von Komplex IV bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. #: Signifikanz zur Atmung des Komplex IV OP 37°C, p-Wert < 0,05. °C: Grad Celsius; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm; p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.2.16. CIV Ratio (Complex IV Ratio)

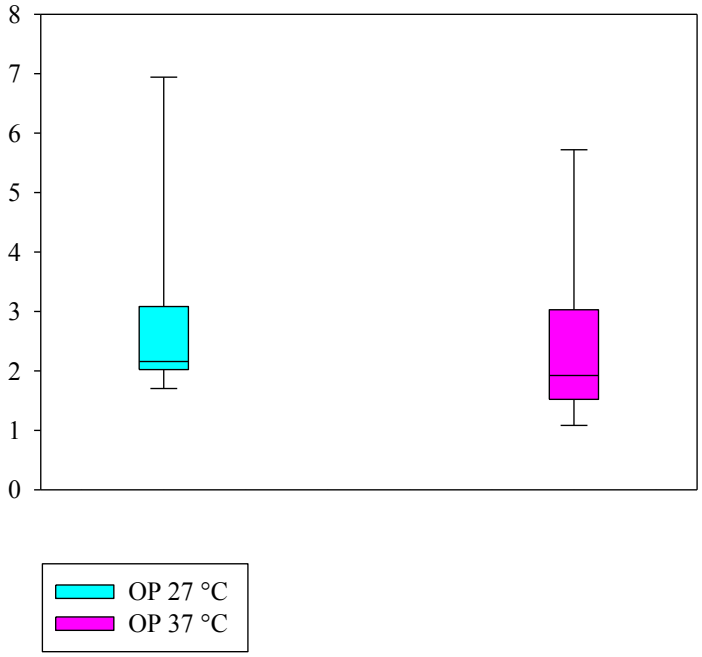

Abb. 28: Vergleich der CIV Ratio bei OP 27 °C- und OP 37 °C-Mäusen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker.
C IV: Komplex IV; °C: Grad Celsius; OP: Operation.

Wie auch schon die CI+CII Ratio und die Cytochrom c Ratio setzt die CIV Ratio in Abb. 28 die Atmung des Komplexes IV in Beziehung zur Atmung nach Gabe von FCCP. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisbar; der im Mann-Whitney Rangsummentest berechnete p-Wert von 0,382 überstieg das Signifikanzniveau von 0,05.

3.3. Messungen im OXYGRAPH-2k bei 30 °C

3.3.1. State 2-Atmung des Komplex I

Abb. 29 stellt die State 2-Atmung des Komplex I unter Malat und Glutamat der Messungen bei 30 °C gegenüber der State 2-Atmung unter Malat, Glutamat und Succinat der Messungen bei Temperaturen im Oxygraphen von 37 °C dar. Die Untersuchung der Gruppen auf statistisch signifikante Unterschiede hin mittels der Kruskal-Wallis ANOVA (analysis of variance) on ranks mit anschließendem Dunn´s Test ergab sowohl für die Gruppe der OP 37 °C als auch der der OP 27° C-Tiere eine im Vergleich zu den Messungen bei einer Temperatur von 30 °C im Oxygraphen eine signifikant höhere Atmungsaktivität im State 2.

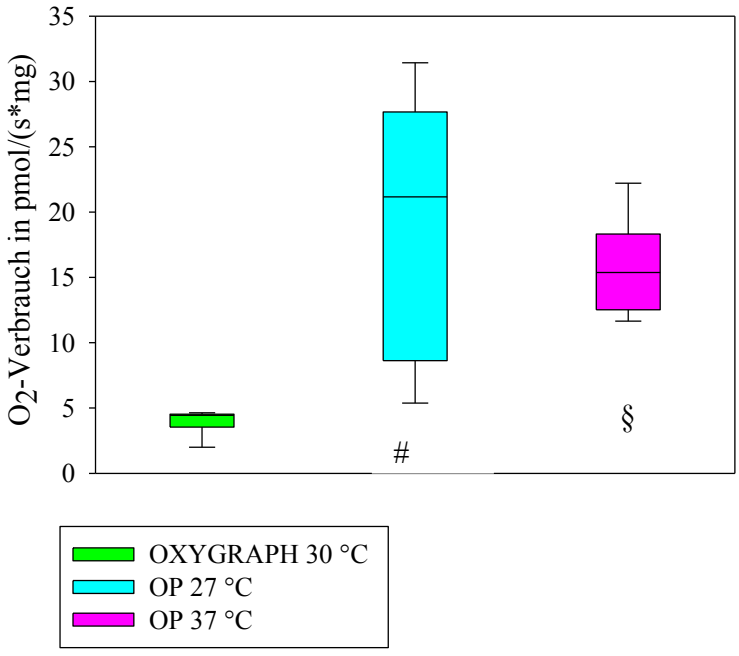

Abb. 29: Vergleich der State 2-Atmung der Messungen bei 30 °C und 37 °C im Oxygraphen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. #: Signifikanz zur OXYGRAPH-Messung bei 30 °C, p-Wert <0,05. §: Signifikanz zur OXYGRAPH-Messung bei 30 °C, p-Wert <0,05. °C: Grad Celsius; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm; p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.3.2. State 3-Atmung des Komplex I

Abb. 30 vergleicht die gekoppelte Atmung mit ATP-Synthese (State 3-Atmung) der Messungen bei 30 °C bzw. 37 °C im Oxygraphen. Auch hier wurden die Kruskal-Wallis ANOVA on ranks sowie der Dunn´s Test durchgeführt. Diesmal ergab sich eine signifikante Differenz bezüglich der bei 30 °C im Oxygraphen gemessenen Tiere und der OP 27 °C-Tiere, welche eine bedeutend höhere State 3-Atmungsaktivität unter ATP-Synthese aufweisen.

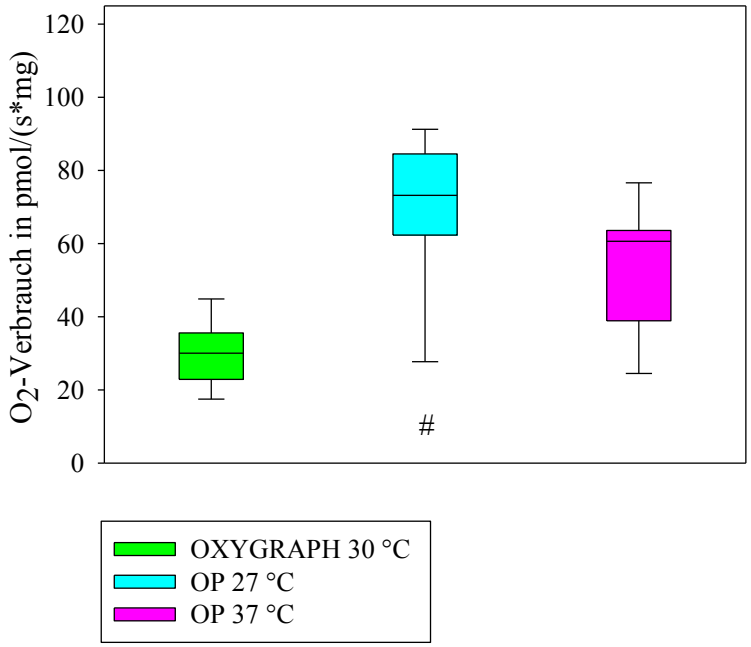

Abb. 30: Vergleich der State 3-Atmungsaktivitäten der Messungen bei 30 °C und 37 °C im Oxygraphen
Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. #: Signifikanz zur OXYGRAPH-Messung bei 30 °C, p-Wert <0,05. °C: Grad Celsius; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm; p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.3.3. RCR (Respiratory Control Ratio) des Komplex I unter ADP

Abb. 31 veranschaulicht die RCR des Komplex I (State 3-Atmung im Verhältnis zur State 2-Atmung) der bei 30 °C durchgeführten Messungen mit der RCR der Komplexe I und II

der beiden Gruppen, deren Atmungsaktivitäten bei 37 °C erhoben wurden. Die vorgenommene Überprüfung auf statistisch bedeutsamen Abweichungen zwischen den einzelnen Gruppen hin durch die Kruskal-Wallis ANOVA on ranks ergab kein signifikantes Ergebnis.

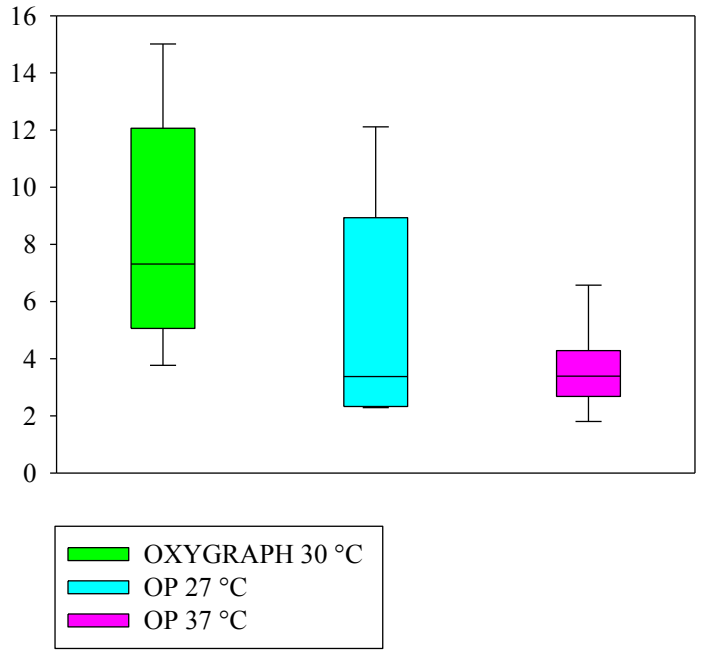

Abb. 31: Vergleich der RCR von Komplex I der Messungen bei 30 °C im Oxygraphen mit der RCR der Komlexe I und II der beiden bei 37 °C gemessenen Gruppen

Date jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation; RCR: Respiratory Control Ratio.

3.3.4. State 3c-Atmung

In Abb. 32 werden die nach Stimulation mit Cytochrom c erhaltenen Atmungsaktivitäten der Untersuchungen im Oxygraphen bei 30 °C sowie die der bei 37 °C erhobenen Messungen gezeigt. Die Kruskal-Wallis ANOVA on ranks mit folgendem Dunn´s Test ergab für beide Messungen bei 37 °C im Oxygraphen statistisch signifikant höhere Werte gegenüber der Messungen bei 30 °C.

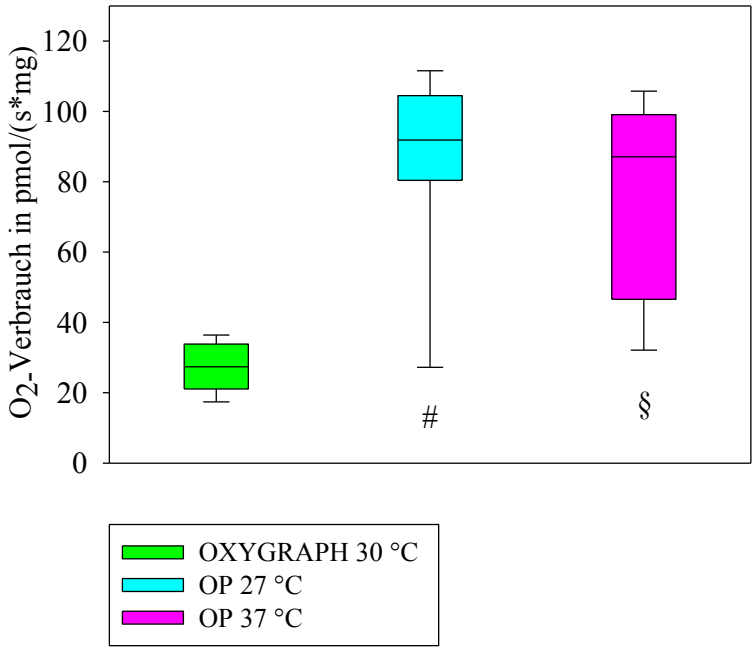

Abb. 32: Vergleich der State 3c-Atmung der Messungen bei 30°C bzw. 37 °C im Oxygraphen

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. #: Signifikanz zur OXYGRAPH-Messung bei 30 °C, p-Wert <0,05. §: Signifikanz zur OXYGRAPH-Messung bei 30 °C, p-Wert <0,05. °C: Grad Celsius; c: Cytochrom c; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm; p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.3.5. Cytochrom c Control Ratio

Abb. 33 gibt die Cytochrom c Control Ratio (State 3c-Atmung im Verhältnis zur State 3-Atmung) der Messungen bei 30 °C und 37 °C im Oxygraphen wieder. Die zur statistischen Analyse herangezogene Kruskal-Wallis ANOVA on ranks kombiniert mit dem Dunn´s Test ermittelte eine signifikant höhere Cytochrom c Control Ratio der bei 37°C gemessenen Tiere mit einer Kerntemperatur von ca. 37 °C während der Operation gegenüber der bei 30 °C im Oxygraphen untersuchten Mäuse.

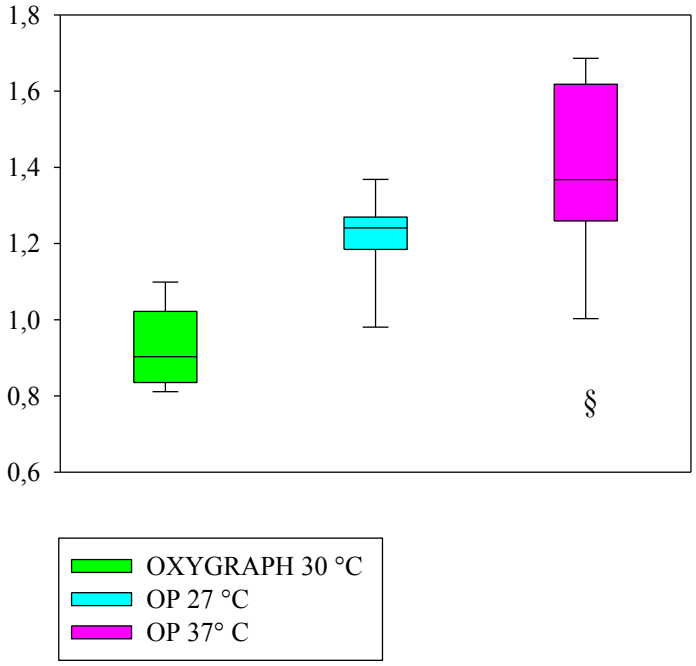

Abb. 33: Vergleich der Cytochrom c control Ratio der Messungen bei 30 °C bzw. 37 °C im Oxygraphen
Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker.
§: Signifikanz zur OXYGRAPH-Messung bei 30 °C, p-Wert <0,05. °C: Grad Celsius; OP: Operation; p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.3.6. RCR (Respiratory Control Ratio) des Komplex I unter Cytochrom c

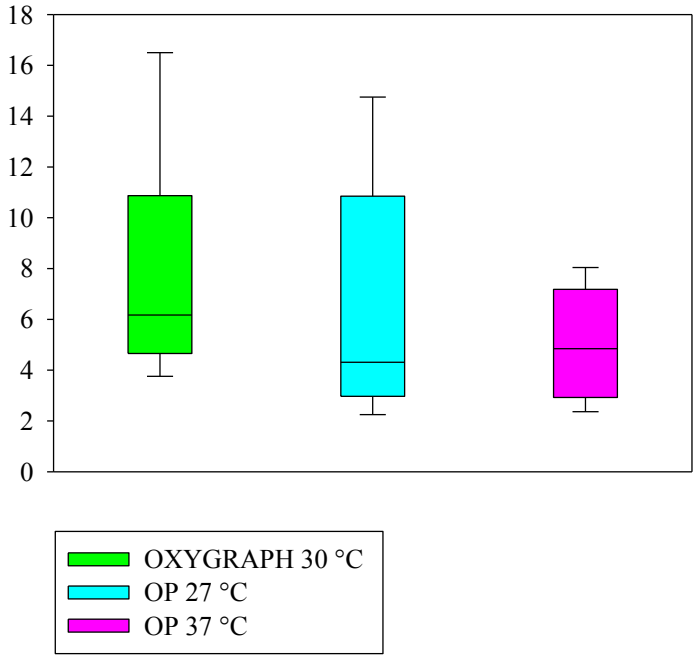

Abb. 34: RCR des Komplex I unter Cytochrom c der bei 30 °C im Oxygraphen untersuchten Mäuse verglichen mit der RCR der Komplexe I und II unter Cytochrom C der bei 37 °C untersuchten Tiere

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; OP: Operation; RCR: Respiratory Control Ratio.

In Abb. 34 ist die RCR des Komplexes I (State 3c-Atmung zu State 2-Atmung) der bei 30 °C untersuchten Atmungsaktivität der Mitochondrien gegenüber der RCR der Komplexe I und II der beiden Gruppen der bei 37 °C im Oxygraphen bestimmten Atmungsraten aufgetragen. Die Überprüfung der RCR des Komplexes I bzw. der Komplexe I und II auf statistisch bedeutsame Unterschiede hin mit Hilfe der Kruskal-Wallis ANOVA on ranks kam zu dem Resultat, dass es hier keine bemerkenswerten Differenzen zwischen den einzelnen Kollektiven gibt.

3.3.7. Atmung des Komplexes II unter Cytochrom c

Abb. 35 vergleicht die Atmung des isolierten Komplexes II unter Cytochrom c bei einer Messtemperatur von 30 °C im Oxygraphen mit der gemeinsamen Atmung der Komplexe I und II nach Cytochrom c-Stimualtion der beiden OP-Gruppen bei einer Temperatur von jeweils 37 °C in den Messkammern. Zur Überprüfung der drei Gruppen hinsichtlich einer statistisch signifikanten Differenz wurde eine Kruskal-Wallis ANOVA on ranks vorgenommen. Diese konnte jedoch keine hervorstechenden Unterschiede aufdecken.

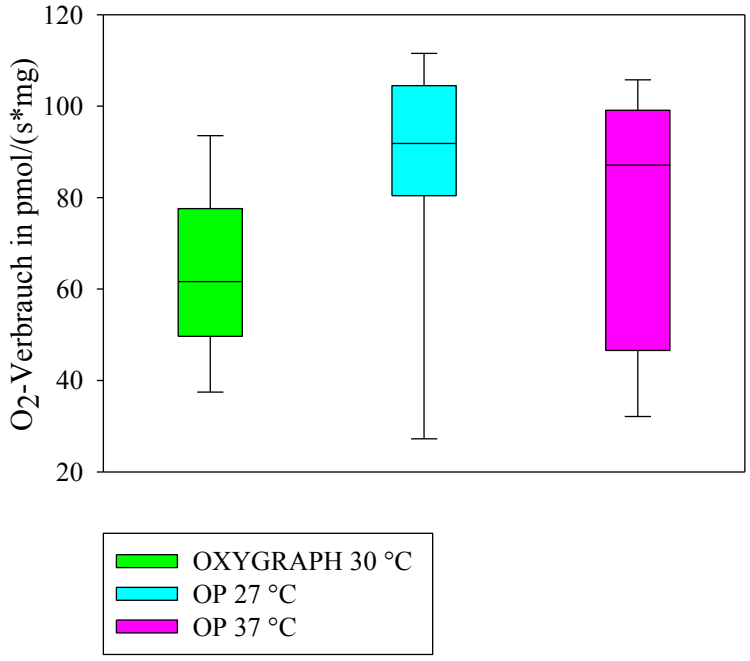

Abb. 35: Atmung des Komplexes 2 unter Cytochrom c

Daten jeweils angegeben als Boxplot, dabei gilt: Median: Querbalken; 1. Quartile: untere Begrenzung der Box; 3. Quartile: obere Begrenzung der Box; Minimum: unterer Whisker; Maximum: oberer Whisker. °C: Grad Celsius; O_2: Sauerstoff; OP: Operation; pmol/(s*mg): Picomol pro Sekunde und Milligramm.

4 Diskussion

In der Diskussion werden die Ergebnisse im Hinblick auf die in der Einleitung formulierten Fragestellungen diskutiert. Dabei wird im ersten Abschnitt die Methodik der mechanischen Permeabilisierung als gleichwertige Alternative zur chemischen Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin evaluiert, während die Charakterisierung des Protokolls und seiner Eignung zur Untersuchung der mitochondrialen Funktion der Lebermitochondrien der Maus im zweiten Abschnitt im Mittelpunkt stehen. Der dritte Teil beschäftgigt sich mit der Analyse der Temperatureffekte auf die Mitochondrien aus Mäuseleberbiopsien. Der letzte Teil widmet sich der Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Temperaturen während der Messungen im OXYGRAPH-2k auf die mitochondriale Atmung.

4.1. Permeabilitätsmessungen

Das Ziel dieses Teils der Untersuchungen war es, vor den Messungen der Temperatureffekte die Qualität der mechanischen Permeabilisierung der Zellen zu überprüfen, da, falls sich diese Methodik als unzureichend herausstellen sollte, eine Änderung der Vorgehensweise vor weiteren Untersuchungen nötig gewesen wäre. Darum interessierten vor allem zwei Dinge: 1. Ist es überhaupt möglich, anhand mechanisch permeabilisierter Leberzellen der Maus die mitochondriale Funktion zu untersuchen? 2. Ist eine zusätzliche chemische Permeabilisierung mit Digitonin nötig oder sogar schädlich? Dazu verabreichten wir Digitonin, ein Steroidsaponin aus den Samen des roten Fingerhutes, das schon in mikromolekularen Dosierungen durch Bildung von Komplexen mit Cholesterin Membranen auflösen kann [Fallert-Müller et al. 1999; Allgeyer 2005; Racine et al. 1993]. Außer zur Permeabilisierung wird Digitonin aufgrund seiner starken Oberflächenaktivität auf Erythrozytenmembranen auch als Hämolysereagenz oder zur Solubilisierung von Rezeptoren eingesetzt [Fallert-Müller et al. 2000; Allgeyer 2005]. Neben dem in vitro-Einsatz gibt es auch die Möglichkeit, diese Substanz in vivo zu verabreichen [Racine et al. 1993]. Das Verfahren mit Digitonin ist die gängige Methode, Gewebe zu permeabilisieren und Mitochondrien zu isolieren [Gnaiger et al. 1998 a]. Dementsprechend wird es in einer Vielzahl von Protokollen angewendet [Fontaine et al. 1995; Gnaiger et al. 1999; Saks et al. 1991]. In mit Saponin oder Digitonin bearbeiteten Geweben sollen aufgrund der ausschließlich auf das Cholesterin ausgerichteten Wirkungsweise dieser Substanz die Morphologie der Mitochondrien [Altschuld et al. 1985] einschließlich ihrer Matrixenzyme [Livingston et al. 1996] sowie ihr Kontakt zum Zytoskelett weitestgehendst intakt bleiben [Birkdale und Gesser

2003; Hilton et al. 2010; Saks et al. 1994; Saks et al. 1998]. Diese selektive Wirkung wird damit erklärt, dass Saponin und Digitonin speziell cholesterinreiche Membranen wie die Plasmamembran angreifen, während sie gegenüber den cholesterinarmen Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien eine geringere Affinität aufweisen. Diese werden erst bei höheren Konzentrationen der Substanzen attackiert [Saks et al. 1998]. Somit kann man über die Menge an Steroidsaponinen steuern, ob man intakte Mitochondrien oder Mitoplasten mit zerstörter äußerer, aber erhaltener inneren Membran vorliegen hat [Saks et al. 1998]. Dieses Verfahren hat im Gegensatz zu Studien an isolierten Mitochondrien die Vorteile, dass man nur geringe Mengen an Gewebe benötigt, alle Populationen von Mitochondrien untersucht werden können, während ihre natürliche Umgebung erhalten bleibt, und nun mittels Zugabe von Substraten ins Medium das sie umgebende Millieu kontrollierbar wird [Saks et al. 1998]. Der Nachteil ist allerdings, dass es bei der Verwendung zu hoher Konzentrationen zu einer vollständigen Zerstörung der mitochondrialen Membranen und einer Freisetzung der Matrix-Enzyme kommen kann [Hoppel und Cooper 1968; Saks et al. 1998]. Hierbei ist die äußere Membran sensibler gegenüber Saponin oder Digitonin als die Innere [Saks et al. 1998]. Auch bedarf es einer relativ langen Einwirkzeit, bis die Chemikalien ihre volle Wirksamkeit entwickeln, während derer es zu zusätzlichen Gewebeschädigungen kommen kann [Kuznetsov et al. 2002]. Bei unseren Messungen zeigten die Mäuse nach Verabreichen von Succinat eine mediane Atmungsaktivität von 67,8 pmol/(s*mg), nach dem Hinzufügen von Digitonin betrug sie im Median 64,6 pmol/(s*mg). An diesen Werten sieht man, dass sich der O_2-Verbrauch nach Gabe von Digitonin im Vergleich zum Verbrauch nach Succinat nur unwesentlich veränderte. Diese Tatsache wird auch durch den Wilcoxon-Rangtest bestätigt, der keinen signifikanten Atmungsanstieg unter Digitonin feststellen konnte. Daraus lässt sich folgern, dass sich die Durchlässigkeit der Leberzellen durch Digitonin nicht erhöhen ließ, da die Zellen durch das mechanische Verfahren schon maximal permeabilisiert waren. Beim Betrachten der Daten fällt weiterhin auf, dass es unter dem Einfluss von Digitonin zu einer, wenn auch sehr leichten, Abnahme der Atmung kam. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Hämolysereagenz nicht nur die Membranen der Leberzellen, sondern auch die der Mitochondrien angreift. Solche Beobachtungen machten auch Hoppel und Cooper, die feststellten, dass Digitonin bei wiederholter Anwendung sowohl die äußere als auch die innere Mitochondrienmembran von isolierten Rattenmitochondrien zerstört [Hoppel und Cooper 1968]. Da die Mitochondrien in unserer Präparation durch die mechanische Permeabilisierung ebenfalls quasi isoliert vorlagen, ist eine Schädigung der Membranen durch die

Chemikalie nicht ganz auszuschließen. Wie oben bereits erwähnt, wendeten auch Kuznetsov et al. Digitonin auf ihre mechanisch permeabilisierten Biopsien aus der Schweineleber an, um so die Qualität dieses Verfahrens zu testen. Korrelierend mit unseren Ergebnissen kam es zu keinerlei Anstieg der Atmung und die erhaltenen Werte glichen derer isolierter Mitochondrien. Daraus ließ sich schließen, dass die Enzyme und Stoffwechselprodukte noch vollständig erhalten waren [Kuznetsov et al. 2002]. Ein weiterer Vorteil des mechanischen Verfahrens ist der, dass die Gewebeproben sofort verarbeitet werden können, ohne lange Zeit in einer chemischen Substanz eingelegt werden zu müssen. Dadurch ist das Gewebe noch frischer, was die Qualität der Ergebnisse erhöht, und einer Selektion bestimmter Populationen wird vorgebeugt. Dies ist wichtig, denn bei der Analyse der mitochondrialen Funktion ist es essenziell, frisches Gewebe zu verwenden, da bei jedem Lagerungsverfahren, z.B. Gefrieren und Auftauen von Gewebeproben, die membrangebundenen Enzyme verändert werden [Lee 1995]. Abschließend kommt man also zu dem Schluss, dass die mechanische Permeabilisierung von Biopsien aus der Mäuseleber zur Untersuchung der mitochondrialen Funktion geeignet und dem chemischen Verfahren ebenbürtig ist. Eine zusätzliche Permeabilisierung mit Digitonin oder Saponin ist nicht notwendig, sondern wäre aufgrund der Gefahr der Übertritrierung dieser Stoffe eher schädlich für die Mitochondrien, da bei zu hohen Mengen dieser Substanzen auch die mitochondrialen Membranen angegriffen werden könnten. Folglich kann für die Untersuchung von Temperatureffekten auf die Mitochondrienfunktion in Mäuseleberbiopsaten das Verfahren der mechanischen Permeabilisierung angewendet werden.

4.2. Temperatureffekte

4.2.1. Protokoll

In dieser Arbeit wurde eine neue Variante eines Messprotokolls angewendet. Da das Messprotokoll ausschlaggebend für die Interpretation der gewonnen Daten ist, wird es im Folgenden vor der Diskussion der Temperatureffekte kurz genauer charakterisiert werden.

4.2.1.1. Malat, Glutamat und Succinat

Malat und Glutamat dienen als Substrate für den Komplex I, während Succinat dazu beiträgt, über den Komplex II Elektronen in die Elektronentransportkette einfließen zu lassen [Gnaiger 2008 c, 2009], wodurch nun eine State 2-Atmung mit einer Begrenzung durch einen Mangel an ADP vorliegt [Gnaiger 2008 d]. Das Besondere an diesem Protokoll ist, dass auf diese Weise beide Komplexe gleichzeitig Elektronen in die Atmungskette ein-

bringen. Damit steht es im Gegensatz zu den üblichen Verfahren, bei denen die beiden Komplexe getrennt voneinander untersucht werden. Dabei wird immer nur der eine oder der andere Komplex stimuliert. Dieses entspricht aber nicht den natürlichen Bedingungen, da hier die Elektronen an der sog. „Q-junction“ [Gnaiger 2009, 2008 c; Gnaiger et al. 2005] (das Ubiquinon = Q bildet die Schnittstelle des ETS mit den Reduktionsäquivalenten) von beiden Komplexen gleichzeitig in das ETS eingespeist werden. In diesem Protokoll werden die physiologischen Verhältnisse dadurch nachempfunden, dass durch die Gabe der drei Substanzen eine Art von Zitratzyklus entsteht, der in sich geschlossen ist. Somit wird verhindert, dass dem Mitochondrium während der Messung entscheidende Substrate fehlen [Gnaiger 2008 c, 2009]. Gibt man nur die Substrate für Komplex I wie Glutamat, Malat oder Pyruvat, so ist einerseits der Zitratzyklus nicht geschlossen, weil Citrat, Isocitrat, 2-Oxoglutarat und Succinat aus dem Mitochondrium ins Nährmedium übertreten, und anderseits fließen nur über den Komplex I Elektronen in die Atmungskette [Gnaiger 2008 c, 2009]. Deshalb entspricht bei einem solchen Protokoll die gemessene Atmungsaktivität nicht der unter natürlichen Bedingungen [Gnaiger 2008 c, 2009]. Das Problem ist, dass bisher kein einheitlicher Konsens darüber besteht, welche Substratkombination denn nun tatsächlich die maximal mögliche physiologische Atmung erzeugt. Deshalb gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Protokollen, von denen jedes den Anspruch erhebt, die höchstmögliche Atmung hervorzurufen, obwohl z.B. lediglich Substrate für den Komplex I gegeben werden, während der Anteil des Komplexes II als Elektronendonor außer Acht gelassen wird. Meistens wird im Anschluss an die Substrate für Komplex I Succinat in Kombination mit Rotenon verabreicht, wodurch dann isoliert Elektronen über den Komplex II in das ETS einfließen, da der Komplex I durch das Rotenon ausgeschaltet wird [Gnaiger 2009]. In Protokollen, in denen nur der Komplex II stimuliert werden soll, ist es unbedingt nötig, den Komplex I zu hemmen, da sonst die Succinatdehydrogenase durch das anfallende Oxaloacetat gehemmt werden würde [Gnaiger 2008 b, 2009]. Dabei hatten schon Rasmussen et al. im Jahre 1996 bei der Untersuchung von Skelettmuskeln des Schweins festgestellt, dass die Kombination von Glutamat als Substrat für den Komplex I mit Succinat als Substrat für den Komplex II unter ADP wesentlich höhere Atmungsaktivitäten aufzeigte, als die Kombinationen Malat/Glutamat und Pyruvat/Malat, die beide nur den Komplex I anregen [Rasmussen et al. 1996]. Ähnliche Ergebnisse erhielten die Forscher auch in den Jahren 1997, 2000 und 2001 bei der Untersuchung der Brustmuskulatur der Taube und des menschlichen Skelettmuskels [Rasmussen und Rasmussen 1997, 2000; Rasmussen et al. 2001 a, b]. In neuerer Zeit wurde der synchrone Elektronenfluss

über die Komplexe I und II unter anderem auch zur Erforschung der kälteadaptierten Thermogenese im menschlichen Skelettmuskel durch mitochondriale Entkopplung [Wijers et al. 2008] und der Defizite des muskulären O_2-Sensors Phd1 (Prolylhydroxylase 1) [Aragonés et al. 2008] eingesetzt. Auch in der aktuellen Forschung über die Beteiligung von Mitochondrien in der Genese von Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes mellitus findet der synchrone Elektronenfluss auf das ETS über beide Komplexe gleichzeitig Anwendung [Boushel et al. 2007; Phielix et al. 2008; Rabøl et al. 2009]. Da sich die Idee der Stimulation der beiden Komplexe gleichzeitig bisher noch nicht sehr etablieren konnte, gibt es nicht viele Protokolle dieser Art. Wie an den Beispielen erkenntlich, beschäftigen sich die wenigen, die diese Tatsache beachten, meistens mit der Untersuchung von Muskeln, sodass wir mit der Anwendung dieser Erkenntnis auf die Mitochondrien der Mäuseleber relatives Neuland betreten und die Ergebnisse nur mit den Forschungen an Muskeln vergleichen können.

4.2.1.2. ADP

Die ADP-Konzentration um das Mitochondrion herum gilt als einer der Hauptfaktoren für die Regulation der ATP-Synthese [Birkdale und Gesser 2003]. Um ihre Funktion, die Produktion von ATP, erfüllen zu können, sind die Mitochondrien dringend auf ADP als Substrat für die ATP-Synthetase angewiesen. Mangelt es an diesem, kann es keine oxidative Phosphorylierung geben und die ATP-Synthetase hemmt die Atmungsaktivität der anderen Komplexe [Chance und Williams 1955 a]. Im vorliegenden Protokoll wird durch die Gabe von ADP ein „State 3“ induziert. Nun ist die ATP-Synthetase dank des ADPs im Überfluss in der Lage, ATP zu produzieren und die durch das Fehlen dieser Substanz verursachte Hemmung ist aufgehoben [Gnaiger et al. 2005]. Jetzt kommt es zu einer maximalen Stimulation mit ATP-Produktion, die der unter physiologischen Verhältnissen unter den hier herrschenden Bedingungen noch am ehesten entspricht [Gnaiger et al. 2005] und die Atmungsaktivität untersteht komplett der Kontrolle des phosphorylierenden Systems [Phielix et al. 2008]. Physiologisch gilt, dass die Atmungsaktivität abnimmt, sobald die Versorgung mit ATP ausreichend ist. In diesem Fall wird also das Ausmaß des Elektronentransports durch die ATP-Synthetase reguliert [Nelson et al. 2005].

4.2.1.3. Cytochrom c

Cytochrom c ist ein wasserlösliches Protein, das sich im Intermembranspalt des Mitochondrions befindet [Sarti et al. 1999]. Es wird basierend auf der DNA der Zelle im Zytoplasma

als Vorläuferprotein Apocytochrom c produziert und anschließend mithilfe des TOM (Translocases in the outer membrane)-Komplexes unabhängig von ATP oder dem Bestehen eines elektrochemischen Potentials über der inneren Mitochondrienmembran in den Intermembranspalt verlagert [Diekert et al. 2001; Vestweber und Schatz 1988; Wang et al. 1996]. Hier wird ihm, vermittelt durch das dort lokalisierte Enzym Cytochrom c-Häm-Lyase, Häm angehängt, wodurch es zum fertigen Cytochrom c wird. Dieser Vorgang ist nötig, da das Cytochrom c mit Häm nicht in der Lage ist, die äußere Membran zu überwinden, das heißt intakte Mitochondrien können kein Cytochrom c von außen aufnehmen [Diekert et al. 2001; Vestweber und Schatz 1988; Wang et al. 1996]. Es erfüllt im Organismus mehrere Aufgaben. Eine davon ist es, bei seiner Freisetzung aus dem Mitochondrium, z.B. im Rahmen eines Herzinfarktes, eine Kette von Caspasen, an deren Ende die Apoptose der Zelle steht, zu aktivieren [Borutaite et al. 2001; Kuznetsov et al. 2004; Von Ahsen et al. 2000]. Cytochrom c und O_2 bilden die benötigten Substrate der COX [Gnaiger und Kuznetsov 2002]. Bei einem Mangel an Cytochrom c kann die COX die über die Komplexe der Atmungskette transportierten Elektronen nicht mehr unter der Bildung von Wasser auf molekulares O_2 übertragen [Nelson et al. 2005]. Dadurch kommt es dann zu einer Verminderung der Atmung [Gnaiger 2008 c] und damit auch der ATP-Produktion. Die Beschädigung der äußeren Mitochondrienmembran in Verbindung mit dem Verlust von Cytochrom c gehört zu den häufigen Fehlerquellen bei der Präparation isolierter Mitochondrien [Rasmussen und Rasmussen, 1997]. Deshalb wird Cytochrom c gegeben, um zu Überprüfen, ob sich die Atmung durch die Gabe dieser Substanz steigern lässt. Ein Anstieg der Atmungsaktivität ließe sich auf eine Verletzung der äußeren Membran zurückführen, durch welche Cytochrom c aus dem Mitochondrium austreten kann. Dieses Vorgehen wird in der Literatur „Cytochrom c-Test“ genannt [Gnaiger 2009; Kuznetsov et al. 1996 b; Jüllig et al. 2008; Saks et al. 1993; Saks et al. 1998].

4.2.1.4. Oligomycin

Bei der oxidativen Phosphorylierung kann man die O_2-verbrauchenden Prozesse in zwei Gruppen einteilen: einerseits die Vorgänge, die zur Generierung von ATP dienen, andererseits das Protonen-Leck, das sich durch Stimulation der Atmungsaktivität, Erhöhung der Leckage durch Entkopplung und Hemmung der oxidativen Phosphorylierung noch vergrößern lässt [Hafner et al. 1990]. Oligomycin inhibiert die F_O-Untereinheit (F: F-Typ-ATPase, O: Oligomycin) der ATP-Synthetase, wodurch die ATP-Produktion nicht mehr möglich ist [Bernard et al. 2007; Nelson et al. 2005]. Daraufhin reguliert das Enzym über

seinen hemmenden Einfluss die Atmungsaktivität herunter, sodass die nun verbleibende Leckage-Atmung nicht mehr auf die Produktion von ATP, sondern lediglich auf den Ausgleich des Protonen-Lecks bei maximalem Membranpotential und dem Entweichen von Protonen und Elektronen, die zur Bildung von ROS beitragen, zurückführen lässt [Gnaiger 2001, 2008 e; Groen et al. 1982; Hütter et al. 2004; Nicholls 1974; Wijers et al. 2008]. Dieser sog. „State 4" entspricht der physiologischen Situation, wenn alles ADP verbraucht ist [Chance und Williams 1955 b; St. Pierre et al. 2000]. Im State 4 zeigt die ATP-Synthetase ihren höchstmöglichen Einfluss auf die Atmungskette, da nach ihrer Blockade nur noch eine kompensatorische Ruheatmung möglich ist [Gnaiger 2008 e].

4.2.1.5. FCCP

Die physiologische Bedeutung der Entkopplung, zum Beispiel durch die Aktivierung des „uncoupling protein 1" (UCP1) in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes mittels Fettsäuren liegt darin, Wärme zu produzieren und damit die Kerntemperatur des Organismus auch bei sich wechselnden Umweltbedingungen konstant zu halten [Dulloo und Samec 2001; Breen et al. 2006]. Dabei wird vermutet, dass es außer dem UCP1 noch einige andere anionische Protonen-Carrier gibt, die eine über Fettsäuren hervorgerufene Entkopplung vermitteln können. Dazu gehören unter anderem die UCP2 (Milz, Lunge, Magen, weißes Fettgewebe) und 3 (Skelettmuskel) [Echtay et al. 2002], der Aspartat/Glutamat-Austauscher, der Dicarboxylat-Kanal und der Phosphat-Carrier [Shabalina et al. 2006]. Aber auch ROS können auf zwei Wege eine Entkopplung verursachen: entweder, sie beschädigen die Mitochondrienmembran, oder sie aktivieren das UCP2 [Hütter et al. 2004; Dulloo und Samec 2001]. Als chemischer Entkoppler fungiert in unserem Versuch FCCP, ein hydrophober Protonen-Carrier [Nelson et al. 2005], der es den Protonen ermöglicht, die innere Mitochondrienmembran zu überwinden und somit aus dem Intermembranraum in die Matrix zu gelangen, ohne dabei die ATP-Synthetase als Transporter nützen zu müssen [Gnaiger 2008 e; Gnaiger et al. 1998 c]. Aufgrund dieses „Kurzschlusses" verringert sich das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran, der ATP-Synthetase wird die Kontrolle über die Aktivität des Elektronen- und Protonentransports entzogen [Gnaiger 2008 e; Gnaiger et al. 1998 c] und die ATP-Synthese ist blockiert [Park et al. 2002]. Dadurch wird es den Komplexen ermöglicht, ihre maximalen Kapazitäten des Elektronentransports zu entfalten [Gnaiger 2008 e; Hütter et al. 2007]. Dabei ist die Wirkung von FCCP abhängig vom extra- bzw. intrazellulären pH-Wert [Park et al. 2002]. Beim Verabreichen muss berücksichtigt werden, dass diese Substanz in zu hohen Konzentrati-

onen einen hemmenden Einfluss auf die Atmung ausübt [Gnaiger 2008 e; Gnaiger et al. 1998 c]. Auf welchem Mechanismus diese Hemmung basiert, ist noch nicht ganz geklärt, eine Möglichkeit wird einem vermehrten Ca^{2+}-Ausfluss aus dem Mitochondrium zugeschrieben. In diesem Fall käme es durch die Gabe von Entkopplern zu einem Mangel an Ca^{2+} im Mitochondrium. In isolierten Mitochondrien dienen Ca^{2+} zur Regulation der Atmung über Schlüsselenzyme des Zitronensäurezyklus wie die Pyruvat-, Isocitrat und α-Ketoglutaratdehydrogenase [Gabai 1993]. Die Funktion der Enzyme liegt unter anderem darin, NADH zu erzeugen. FCCP in zu hoher Dosierung würde dann die Atmungsaktivität hemmen, indem es die Verfügbarkeit von NADH als Reduktionsäquivalent für den Komplex I verringert [Gabai 1993]. Andere Autoren vermuten die Depolarisierung der Membran durch FCCP als Grund für den hemmenden Effekt, da so elektrochemisch ins Mitochondrium transportierte Substrate wie Glutamat und Pyruvat nicht mehr ins Mitochondrium gelangen [Hilton et al. 2010; Park et al. 2002]. Das Eintreten der Inhibition durch Entkoppler kann durch das Verabreichen von Oligomycin, das das Membranpotential erhöht und zu einer Akkumulation von Ca^{2+} führt, verlangsamt werden [Gabai 1993]. Die richtige Menge entkoppelnder Substanzen hängt vom Zelltyp, der Konzentration der Zellen und dem Messmedium ab und variiert je nach dem, ob die Zellen intakt oder permeabilisiert sind [Gnaiger 2008 e]. Um nicht zu viel FCCP zu geben, wurde es hier in 1 µl-Schritten titriert.

4.2.1.6. Rotenon und Antimycin A

Rotenon ist ein Hemmer des Komplexes I [Bernard et al. 2007; Hütter et al. 2004; Rasmussen et al. 1996; Rasmussen und Rasmussen 1985]. Es verhindert den Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel-Zentrum der NADH-Dehydrogenase auf das Ubiquinon [Nelson et al. 2005]. In vielen Protokollen wird Rotenon gegeben, um die durch den Komplex II alleine hervorgerufene Atmungsaktivität zu bestimmen [Boushel et al. 2007; Hütter et al. 2007]. Antimycin A inhibiert den Komplex III, indem es die Übertragung der Elektronen vom Cytochrom b auf das Cytochrom c_1 unterbindet [Nelson et al. 2005]. Zusätzlich blockiert es die Protonenpumpe dieses Komplexes [Beavis und Lehninger 1986; Pietrobon et al. 1981]. Wird es in Kombination mit Rotenon verabreicht, kann keine Atmung mehr erfolgen, da nach Blockade des Komplexes III keine Elektronen mehr zur COX fließen. Die verbleibende Hintergrundatmung lässt sich auf Protonenlecks und ROS-Produktion zurückführen [Boushel et al. 2007; Gnaiger 2003, 2008 e; Gnaiger et al. 2000 b]. Bei der Planung ist es wichtig, dass FCCP vor Rotenon und Antimycin A gegeben wird,

da so dem durch sie verursachten Anstieg der ROS vorgebeugt wird [Andreyev et al. 2005; Gnaiger 2008 e; Howland 1968; Murphy 2009].

4.2.1.7. TMPD, Ascorbat und KCN

Nach Antimycin A können keine Elektronen mehr entlang der Komplexe fließen, da sie nach der Hemmung des Komplexes III mit Antimycin A nicht mehr in das ETS eintreten können. Dadurch wird auch die COX in ihrer Funktion gehindert. Um trotzdem eine Aussage über die Atmung des Komplexes IV machen zu können, wird TMPD als künstlicher Elektronendonator für die COX hinzugefügt [Gnaiger et al. 1998 c; Gnaiger und Kuznetsov 2002; Kuznetsov und Gnaiger 2001-2007]. TMPD wird in Anwesenheit von molekularem O_2, je nach O_2-Partialdruck, schnell autooxidiert [Gnaiger 2008 e], wodurch stabile radikale Kationen entstehen, gefolgt von der Bildung von Superoxid-Radikalen und Wasserstoffperoxid [Kuznetsov und Gnaiger 2001-2007]. Um das reduzierte TMPD wieder zu regenerieren und damit seine Konzentration konstant zu halten, wurde Ascorbat gegeben [Gnaiger und Kuznetsov 2002; Kuznetsov und Gnaiger 2001-2007]. Bei diesen Reaktionen, die stark von der O_2-Konzentration abhängig sind, wird O_2 in hohem Maße verbraucht [Gnaiger 2008 e]. Um berechnen zu können, welcher Anteil des Bedarfs auf die COX zurückzuführen ist, wurde KCN gegeben. KCN hemmt die COX, indem es eine Brücke zwischen dem Cytochrom a3 und dem Kupfer B-Zentrum des Enzyms bildet [Boelens et al. 1984; Nelson et al. 2005]. Die gemessene Atmung entspricht nur noch der Autooxidation der Elektronendonatoren [Gnaiger 2008 e; Kuznetsov und Gnaiger 2001-2007].

4.2.2. Diskussion der Temperatureffekte

Dieser Abschnitt beschäftigt sich damit, inwiefern Änderungen der Körpertemperatur Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion haben. Wie beschrieben, müssen die Komplexe unter FCCP ihre maximale Kapazität entwickeln, um zu verhindern, dass das Membranpotential zusammenbricht [Phielix et al. 2008]. Dadurch eignet sich die unter FCCP gemessene Atmung hervorragend dazu, sie als Bezugswert für alle anderen bestimmten Atmungsaktivitäten heranzuziehen und Letztere in Relation zu FCCP anzugeben.

4.2.2.1. Maximale gekoppelte Atmung mit Stimulation der Komplexe I und II

Bei den OP 27 °C-Mäusen beobachtet man im Median eine State 2-Atmung von 21,2 pmol/(s*mg), bei den OP 37 °C-Tieren waren es 15,4 pmol/(s*mg). Hier konnte keine sig-

nifikante Differenz nachgewiesen werden. Bezieht man nun diese State 2-Atmungsaktivität auf die maximale Kapazität nach FCCP-Gabe, so beträgt der Median bei den OP 27 °C-Mäusen 0,129 (entspricht 12,9 % des Wertes von FCCP) und bei den OP 37 °C-Tieren 0,127 (12,7 % von FCCP). Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. In denjenigen Protokollen, die ebenfalls einen parallelen Einfluss der Elektronen über die Komplexe I und II verwenden, wird meistens das Succinat erst nach der Gabe von ADP verabreicht, so dass hier der synchrone Fluss über beide Komplexe nur im State 3 und nie im State 2 bestimmt wird. Dementsprechend liegen für die Analyse der State 2-Atmung unter Malat, Glutamat und Succinat keine Vergleichsdaten vor. Durch die Injektion von ADP wurde nun ein State 3 erreicht und eine schnelle Phosphorylierung von ADP zu ATP war möglich. Die Atmung stieg auf Mediane von 73,2 pmol/(s*mg) (OP 27 °C) bzw. 60,6 pmol/(s*mg) (OP 37 °C) an. Bei dem durchgeführten Mann-Whitney-Rangsummentest lag der ermittelte p-Wert mit 0,05 nur knapp über dem Signifikanzniveau von <0,05. Daher ist ersichtlich, dass unter ADP die OP 27 °C-Tiere stark zu höheren Werten neigen. Die State 3-Atmung unter Malat, Glutamat, Succinat und ADP betrug bei gesunden menschlichen Muskelfasern etwa 85 pmol/(s*mg) [Boushel et al. 2007], bei Mitochondrien aus dem Myokard normotensiver Ratten lag sie bei 29.4+/-4,8 pmol/(s*mg) [Jüllig et al. 2008]. Unsere Werte der Maus liegen im Vergleich dazu sowohl bei den OP 27 °C- als auch bei den OP 37 °C-Tieren zwischen denen von Mensch und Ratte. Die RCR (Respiratory Control Ratio) eines Stoffes ist ein Maß dafür, wie groß sein Einfluss auf die Atmungskette ist bzw. inwiefern er die Atmungsaktivität der Komplexe „kontrolliert“. Die nach dem Hinzufügen von ADP erhobene RCR bezieht sich auf die Komplexe I und II zusammen. Sie betrug bei beiden Gruppen im Median 3,4, das heißt, im Vergleich zur State 2-Atmung steigerte sich die Atmungsaktivität durch ADP um das 3,4-fache. Auch hier konnte kein statistisch bedeutsamer Unterschied festgestellt werden. Diese Werte stimmen gut überein mit den Ergebnissen aus der Literatur, so konnten Gnaiger et al. ebenfalls einen Anstieg der Atmung nach ADP in Lebermitochondrien um das 3-fache beobachten, während Herzmitochondrien nur mit einer Verdoppelung der Atmungsaktivität reagierten [Gnaiger et al. 1998 c]. Lemieux et al. konnten in permeabilisierter Fasern aus dem linken Ventrikel der Maus eine Steigerung der State 3-Atmung des Komplexes I (Malat, Glutamat, Pyruvat, ADP) durch das Hinzuschalten des Komplexes II mittels Succinat um das 1,5-2,0-fache feststellen [Lemieux et al. 2006]. An diesen Beispielen sieht man noch einmal deutlich, dass sich durch die synchrone Stimulation der Komplexe im State 3 wesentlich höhere Atmungsaktivitäten verzeichnen lassen als beim alleinigen Elektronenfluss

über den Komplex I. Insgesamt betrachtet sind die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten über die synchrone Stimulation der Komplexe I und II bei mechanisch permeabilisierten Leberbiopsien der Maus also sehr gut mit den Werten aus der Literatur vergleichbar, wobei sich innerhalb der beiden Versuchskollektive keinerlei signifikanten Unterschiede nachweisen ließen. Dies bedeutet, dass sich zumindest in Bezug auf die parallele Anregung der Komplexe I und II kein Einfluss der Operationstemperatur belegen ließ. In vielen Protokollen wird nach der Gabe von ADP das Maximum der Atmungsaktivität erreicht, so z. B. bei der Untersuchung der mitochondrialen Atmungs in isolierten Mitochondrien [Gnaiger 2001], Saponin-behandelten Fasern des Musculus quadriceps femoris des Menschen [Boushel et al. 2007] und der Maus [Kuznetsov et al. 1996 a] oder bei permeabilisierten menschlichen Augenmuskelfasern [Kunz et al. 2000]. Hier und auch bei Messungen an Schweinemitochondrien konnte sogar gezeigt werden, dass sich die ADP-stimulierte Atmung über die Komplexe I und II selbst durch die Gabe von Entkopplern nicht mehr steigern ließ [Kunz et al. 2000; Zangl 2011]. Dies war bei unseren Messungen an der Maus nicht der Fall, da es durch die Applikation von FCCP zu einem starken Anstieg der Atmung kam, wie man am Quotienten aus der ADP-Atmung und Atmung nach Entkopplung, der CI+CII Ratio unter ADP, erkennen kann. Hier betragen die Werte mit 0,435 (43,5 % von FCCP; Median OP 27 °C-Mäuse) und 0,439 (43,9% von FCCP; OP 37 °C-Mäuse) nur annähernd 50% der Atmung nach FCCP, signifikante Unterschiede lagen nicht vor. Damit wird klar, dass bei der Untersuchung von Mäusemitochondrien zum Erhalt der maximalen Kapazität des ETS immer ein Entkoppler gegeben werden sollte.

4.2.2.2. Cytochrom c-Test

Cytochrom c wurde zur Überprüfung der Unversehrtheit der äußeren Mitochondrienmembran verabreicht. In diesem Protokoll wurde nun untersucht, ob sich durch das Applizieren dieser Substanz von außen die Atmung der Mitochondrien steigern ließ, was dann ein Zeichen für die Schädigung der Membran gewesen wäre. Zu diesem Zwecke wurde nun mit der State 3c-Atmung innerhalb jeder Gruppe ein Wilcoxon-Rangtest für zwei verbundene Stichproben durchgeführt, der bewies, dass bei jedem Kollektiv die Atmung durch Zugabe von Cytochrom c im Verhältnis zur Atmung nach ADP signifikant angehoben wurde. Das könnte bedeuten, beide Untersuchungsgruppen haben einen Membranschaden erlitten und dadurch Cytochrom c verloren. Um zu ermitteln, wie stark der verzeichnete Anstieg ausgeprägt war, wurde nun die Cytochrom c Control Ratio (also die RCR von Cytochrom c) erhoben. Dabei zeigte sich im Median eine Steigerung um den Faktor 1,2 bei den OP 27 °C-

und um 1,4 bei den OP 37 °C-Mäusen. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden: Der Anstieg durch die Cytochrom c-Gabe war bei den OP 37 °C-Tieren größer. Das legt nun die Vermutung nahe, dass die Lebermitochondrien der OP 37 °C-Versuchstiere eine größere Beschädigung der Membran erfahren haben, als die der OP 27 °C-Mäuse. Setzt man nun im Rahmen der Cytochrom c Ratio die Werte unter Cytochrom c in Relation zu denen unter FCCP, erhält man für OP 27 °C-Mäuse einen Median von 0,631 (entspricht 63,1 % der Atmung von FCCP) und für OP 37 °C-Mäuse 0,530 (entspricht 53,0 % der Atmung nach FCCP). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dieser Umstand lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die OP 27 °C-Mäuse sowohl eine höhere Atmung unter Cytochrom c aufweisen, als auch bei FCCP stärker reagieren, wodurch sich das Verhältnis dem der OP 37 °C-Mäuse annähert. Nachdem es nun sehr wahrscheinlich war, dass ein Mangel an Cytochrom c vorgelegen hat, musste nun die RCR von Komplex I und II mit den nach der Gabe dieser Substanz gewonnenen Werten erneut bestimmt werden. Dabei ließ sich bei den OP 27 °C-Mäusen eine im Median 4,3-fache Steigerung zur State 2-Atmung unter Malat, Glutamat und Succinat verzeichnen, bei den OP 37 °C-Mäusen war der entsprechende Faktor 4,8. Auch hier resultierte aus dem Mann-Whitney-Rangsummentest kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Anhand dieses Protokolls ergaben sich zwar Hinweise darauf, dass ein Mangel und damit eine Verletzung der Membran vorgelegen haben könnte; die unter physiologischen Bedingungen herrschenden Zustände konnten aber nicht hergestellt werden, da nicht bekannt war, wie groß das Ausmaß des Cytochrom c-Verlusts war. Darum wurde diese Substanz zum sicheren Ausgleich etwaiger Mängel im Überschuss hinzugefügt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kuznetsov et al. bei der Untersuchung des Phänomens der kardialen kalten Ischämie-Reperfusion an permeabilisierten Myokard-Fasern. Bei diesem Geschehen kommt es regelhaft zu einem Cytochrom c-Verlust aufgrund von Schäden an der äußeren Mitochondrienmembran. Hier ließ sich durch die Substitution von Cytochrom c ebenfalls die Atmungsaktivität anheben [Kuznetsov et al. 2004]. Gnaiger et al., Kunz et al. und Hütter et al. testeten im Rahmen ihrer Experimente ebenfalls mit der zusätzlichen Gabe von Cytochrom c die Intaktheit der mitochondrialen Membran permeabilisierter Muskelfasern des Menschen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten sie jedoch keine Steigerung der Atmung nach Cytochrom c verzeichnen, woraus sie schlossen, dass die Mitochondrien unbeschädigt waren [Gnaiger et al. 2005; Hütter et al. 2007; Kunz et al. 2000]. Auch im Rahmen von Forschungen an Schweinemitochondrien, bei denen dieselbe Technik wie in der vorliegenden Arbeit ver-

wendet wurde, konnte auf die Gabe von Cytochrom c hin keinerlei Reaktion festgestellt werden [Zangl 2011]. Allerdings setzt diese Interpretation des Cytochrom c-Tests immer die weitverbreitete Annahme voraus, dass Mitochondrien nicht in der Lage sind, Cytochrom c aufzunehmen, ohne dass ein Membranschaden vorliegt, da Cytochrom c die Membran nicht überqueren kann [Vestweber und Schatz 1988; Wang et al. 1996]. Nun konnten aber Proger et al. schon im Jahre 1945 bei in vivo-Experimenten an Hunden einen Anstieg des O_2-Bedarfs nach Injektion von Cytochrom c feststellen, was die Vermutung nahe legt, dass das Cytochrom c in die Mitochondrien gelangen kann [Proger et al. 1945], und auch Levy und Deutschman konnten im Rahmen von Sepsisforschungen eine Aufnahme von exogenem Cytochrom c in Kardiomyozyten der Maus und ihre Mitochondrien nachweisen. Dabei nahmen besonders die Tiere der septischen Gruppe große Mengen dieser Substanz auf und hoben damit die Aktivität ihrer COX auf das Niveau der Kontrolltiere an, was ihre linksventrikuläre Funktion annähernd die Werte gesunder Kontrollen erreichen ließ und die Mortalität senkte [Levy und Deutschman 2007]. Ähnliche Beobachtungen machten auch Piel et al., die bei ihrer Forschung an Mitochondrien aus Herzmuskelzellen septischer Mäuse nachweisen konnten, dass wiederholt intravenös verabreichtes Cytochrom c die äußere Mitochondrienmembran überwinden kann und somit die ventrikuläre Funktion verbessert und das Überleben der Tiere verlängert [Piel et al. 2007, 2008]. Sowohl Levy et al. als auch Piel et al. erklärten diese Effekte des exogen verabreichten Cytochrom c damit, dass diese Substanz in den Intermembranspalt gelangt, wo sie die durch die Sepsis bedingte Inhibition der COX aufhebt [Levy und Deutschman 2007; Levy et al. 2004; Piel et al. 2007, 2008]. Dabei ist unklar, wie das Cytochrom c in die Mitochondrien übertreten kann. Als eine mögliche Erklärung dafür, dass die Mitochondrien der Kontrolltiere weniger Cytochrom c aufnahmen, sahen sie, dass hier die durch Sepsis hervorgerufenen Membranschäden fehlten [Levy und Deutschman 2007; Piel et al. 2007, 2008]. Dagegen sprechen allerdings von uns durchgeführte, unveröffentliche Experimente an Lebermitochondrien der Maus, die weder eine Operation noch sonst irgendwelche einschneidende Prozeduren durchlaufen haben und dennoch eine starke Stimulation durch Cytochrom c zeigen. Bei diesen Mitochondrien können keine Membranschäden vorgelegen haben, was ein Hinweis darauf ist, dass Mäusemitochondrien möglicherweise über einen Mechanismus verfügen, der es ihnen ermöglicht, Cytochrom c von außen aufzunehmen. Des Weiteren fielen die Reaktionen auf das Cytochrom c hin immer recht einheitlich aus, was bei schwankender Qualität der Präparation nicht der Fall hätte sein dürfen. Bei der Untersuchung septischer Mäuse war die Reaktion auf Cytochrom c im Vergleich zu den Kontrolltieren ge-

ringer, obwohl man hier aufgrund der stärker ausgeprägten Membranschädigung, vor allem unter der Annahme der Prämisse des Cytochrom c-Tests, das Gegenteil erwartet hätte. Möglicherweise lässt sich dies durch die Vermutung erklären, dass bei septischen Tieren die Atmungsaktivität und damit die Stimulation durch Cytochrom c geringer ausfallen könnte. Ein Ausbleiben der Reaktion auf Cytochrom c z.B. bei Menschen und Schweinen im Vergleich zu Mäusen und Ratten könnte auch auf speziesspezifischen Unterschieden in der mitochondriellen Struktur beruhen, die letztere dazu in die Lage versetzen, Cytochrom c über die äußere Membran hinweg in das Mitochondrium aufzunehmen. Die hier durchgeführte Studie ist nicht dazu geeignet, eine solche These zu belegen, deshalb sollte die Erforschung dieses Phänomens Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Angesichts der Ergebnisse muss man jedoch nun die Anwendung und Auswertung des Cytochrom c-Tests bei der Maus kritisch betrachten, da es sein könnte, dass er in diesem Fall keinerlei Aussage über die Integrität der Mitochondrienmembran zulässt. Worauf dann der Unterschied in der Reaktion der beiden Gruppen zurückzuführen ist, ist unklar. Es wäre möglich, dass das stärkere Ansprechen der OP 37 °C-Tiere durch eine temperaturbedingte höhere Enzymaktivität der Komplexe oder des vermuteten Cytochrom c-Transportmechanismuses verursacht wird.

4.2.2.3. State 4-Atmung

Die mediane Atmungsaktivität nach Verabreichen von Oligomycin betrug bei den OP 27 °C-Mäusen 50,7 pmol/(s*mg) und bei den OP 37 °C-Tieren 49,2 pmol/(s*mg). Zwischen beiden Versuchsgruppen lag kein signifikanter Unterschied vor. Da nun kein ATP mehr produziert werden konnte, ist der verbleibende O_2-Verbrauch auf die Kompensation der Protonenlecks und die ROS-Bildung zurückzuführen [Gnaiger 2001, 2008 e; Groen et al. 1982; Hütter et al. 2004; Nicholls 1974; Wijers et al. 2008]. Der Unterschied zur State 2-Atmung ist der, dass hier durch die vorherige ADP- und Cytochrom c-Applikation die Komplexe dazu stimuliert wurden, ihr unter der Kontrolle durch die ATP-Synthetase maximal möglichstes Membranpotential aufzubauen [Gnaiger 2008 e]. Bei der Blockade durch Oligomycin zeigt die ATP-Synthetase ihren ganzen hemmenden Einfluss auf das ETS. Diese maximale Beeinflussung wird auch in Form der RCR von FCCP mit der maximalen Kapazität des ETS nach FCCP verglichen [Gnaiger 2008 e]. Die Leak Respiratory („Leckage-Atmung“) zeigt nun die Aktivität des ETS unter Hemmung der ATP-Synthetase im Vergleich zur vorherigen Atmung unter Cytochrom c. Hier wurde bei den OP 27 °C-Tieren eine mediane Senkung auf das 0,55-fache (55 % der Atmung unter Cytochrom c)

und bei den OP 37 °C-Mäusen auf das 0,60-fache (60 % der Atmung unter Cytochrom c) festgestellt. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Leak Respiratory nicht bedeutsam. Sowohl menschliche Fibroblastenmitochondrien [Bernard et al. 2007] als auch Mitochondrien aus dem Skelettmuskel der Ratte [Rolfe et al. 1999] reagieren auf die Gabe von Oligomycin mit einem Rückgang der Atmung um 50%. Vergleicht man diese Werte nun mit unserern, so stellt man fest, dass auch sie mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen übereinstimmen. Es zeigten also beide OP-Gruppen gegenüber Oligomycin keinerlei Unterschiede und die Ergebnisse stimmen sehr gut mit der Literatur überein.

4.2.2.4. Entkopplung: Demaskierung der maximalen Kapazität des ETS

Bei der Untersuchung der enkoppelten Atmung unter FCCP ließ sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen, dennoch fällt eine eindeutige Tendenz der OP 27 °C-Mäuse (Median: 176,08 pmol/(s*mg)) zu höheren Werten im Gegensatz zu den OP 37 °C-Mäusen (138,58 pmol/(s*mg)) auf. An der RCR von FCCP erkennt man, dass die Atmung im Vergleich zur Aktivität des vorher verabreichten Oligomycin unter FCCP bei den OP 27 °C-Mäusen im Median um das 3,5-fache und bei den OP 37 °C-Mäusen um das 3,0-fache anstieg. Auch in dieser Beziehung gab es keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen. An der RCR von FCCP kann man ablesen, wie groß die Kontrolle der ATP-Synthetase über die Elektronentransportkette ist, denn sie vergleicht das maximale Potential des ETS, wenn dieses nach der Enkopplung mit FCCP nicht mehr von der ATP-Synthetase reguliert werden kann, mit dem maximalen hemmenden Einfluss der ATP-Synthetase auf das ETS, nachdem das Enzym durch Oligomycin inhibiert wurde [Gnaiger 2008 e]. Die $UCR_{u/D}$ (Uncoupling Control Ratio) setzt die maximale Kapazität des ETS ins Verhältnis mit der maximalen, an die ATP-Produktion gekoppelte Atmung, die durch die Gabe von ADP ermöglicht wird. Im Falle der $UCR_{u/c}$ wurden durch die Substitution von Cytochrom c etwaige Verluste dieses Stoffes korrigiert. An der $UCR_{u/D}$ konnte man sowohl bei den OP 27 °C- als auch bei den OP 37 °C-Tieren erkennen, dass die entkoppelte Atmung um den Faktor 2,3 höher ist als die unter physiologischen Bedingungen. Die unter dem Einfluss von Cytochrom c bestimmte $UCR_{u/c}$ ergab für die OP-27 °C-Mäuse eine Relation von 1,94, die der OP 37 °C-Tiere betrug 1,56. Zwar ist dieser Unterschied nicht signifikant, dennoch lässt sich aber eine Tendenz der OP 27 °C-Gruppe zu höheren Werten bemerken. Insgesamt kann man an den vorliegenden Daten ersehen, dass die Entkopplung bei der Maus eine eindeutige Steigerung der Atmungsaktivität bewirkt. Diese ist sehr viel ausgeprägter als z.B. beim Schwein, bei dem sich die Atmungsrate durch FCCP

nicht anheben lässt [Zangl 2011]. Hierfür ergeben sich drei mögliche Erklärungen: Zum einen könnte die Hemmung durch die ATP-Synthetase so stark sein, dass die Komplexe unter physiologischen Bedingungen nur schwer an ihre eigentlichen Fähigkeiten heranreichen können. Zum anderen könnten Mäuse eine größere Reserve für Situationen, in denen schnell möglichst viel ATP produziert werden muss, besitzen. Auch bei der Untersuchung kultivierter endothelialer Zellen konnte eine durch die Gabe von geringen Konzentrationen an FCCP induzierte Steigerung der Atmungsaktivität um mehr als das doppelte im Vergleich zur gekoppelten Atmung beobachtet werden [Gnaiger et al. 1998 c], menschliche endotheliale Zellen aus der Nabelvene reagieren auf FCCP mit einem Anstieg um das 3,5-fache [Steinlechner-Maran et al. 1996], während das Ansprechen auf FCCP bei der Maus in Mitochondrien des braunen Fettgewebes sogar noch größer ist als in den Mitochondrien aus der Leber [Shabalina et al. 2006]. Ein dritter Erklärungsansatz könnte sein, dass das starke Ansprechen der Mäusemitochondrien z.B. im Vergleich zum Schwein ein durch das Verfahren der mechanischen Permeabilisierung bedingtes Artefakt darstellen könnte.Daher wäre es interessant, das Experiment mit Biopsien aus Schweinelebern zu wiederholen.

4.2.2.5. Komplex IV

Die gemessene Atmung des Komplex IV erreichte Werte von 352,2 pmol/(s*mg) (Median) bei den OP 27 °C-Mäusen und 301,9 pmol/(s*mg) (Median) bei den OP 37 °C-Tieren. Hier gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen: die Atmung des Komplexes IV war bei den OP 27 °C-Tieren höher. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Komplex IV bei den OP 37 °C-Mäusen einen größeren Schaden davongetragen hat, als der der OP 27 °C-Mäuse. Mittels der CIV Ratio wurde nun die isoliert untersuchte Kapazität des Komplexes IV dem entkoppelten Potential des ETS nach FCCP gegenübergestellt. Hier ergab sich ein Ergebnis von 2,157 (215,7 % der Atmung nach FCCP; Median) für die OP 27 °C- und 1,923 (192,3 % der Atmung nach FCCP; Median) für die OP 37 °C-Mäuse. Die beiden Kollektive differierten in Bezug auf die CVI Ratio nicht, was sich möglicherweise damit erklären lässt, dass die OP 27 °C-Mäuse auch bei der Atmung unter FCCP eine Tendenz zu höheren Werten hatten, weshalb sich die Quotienten der Gruppen wieder annäherten. Allerdings sieht man an den hohen Beträgen, dass der O_2-Verbrauch des Komplexes IV alleine bei beiden Gruppen in etwa doppelt so hoch war wie die Aktivität der Komplexe I-IV gemeinsam nach Entkopplung. Das ist ein Hinweis darauf, dass die COX alleine ein sehr viel höheres Potential hat, als sie es im Rahmen der Atmungskette in Verbindung mit den anderen Komplexen ausschöpfen kann. Dieses Ergeb-

nis zeigte sich auch in zahlreichen anderen Versuchen [Garedew et al. 2006; Gnaiger und Kuznetsov 2002; Gnaiger et al. 1998 c; Gnaiger 2003], z.B. konnten Gnaiger und Kuznetsov bei der Untersuchung von Mitoplasten aus Rattenherzen ebenfalls eine doppelt so hohe Atemaktivität der Mitochondrien mit TMPD als Elektronendonator im Vergleich zum physiologischen Weg mit Succinat als Substrat feststellen [Gnaiger und Kuznetsov 2002]. Auch bei Experimenten an permeabilisierten Fasern des linken Ventrikels der Maus ergab sich beim Vergleich der Atmung mit parallelem Fluss der Elektronen über Komplex I und II nach Entkopplung mit FCCP mit der Atmung des isolierten Komplexes IV eine 1,3-fach höhere Atmung für die COX alleine [Garedew et al. 2006]. Dieser Übermaßkapazität ist es zu verdanken, dass eine durch Substratmangel hervorgerufene Hemmung der COX sich erst bei sehr niedrigen Konzentrationen der Substrate (Cytochrom c und O_2) auf die Aktivität der Atmungskette auswirkt. Dies betrifft vor allem das Cytochrom c, dessen Mangel bis zu einem gewissen Schwellenwert gut kompensiert werden kann, während eine Inhibition der COX durch den Abfall des O_2-Partialdruckes sofort zu einem Absinken der mitochondrialen Atmung führt [Gnaiger und Kuznetsov 2002]. Deshalb ist zu erwarten, dass der regulatorische Einfluss der COX auf die Atmungsaktivität unter physiologischen O_2-Partialdrücken größer ist als unter den bei den gängigen Experimenten herrschenden hohen O_2-Konzentrationen [Gnaiger et al. 1998 b]. In der Literatur findet sich eine mögliche Erklärung für die COX-Übermaßaktivität darin, dass die COX sie unter physiologischen Verhältnissen benötigt, um trotz ihrer durch die geringe O_2-Konzentration bedingten niedrigen Umsatzrate noch eine ausreichend hohe O_2-Affinität aufrechterhalten zu können und damit optimale Rahmenbedingungen für einen reibungslosen Ablauf der Zellatmung schaffen zu können [Gnaiger et al. 1998 c]. Andere sehen die biologische Bedeutung der hohen COX-Kapazitäten darin, dass Gewebe mit einer hohen Aktivität der COX schneller auf eine plötzliche Erhöhung des Energibedarfs reagieren können [Bernard et al. 2006]. Vor allem bei mitochondrialen Defekten ist die Übermaßaktivität von besonderer Bedeutung, da hier die Aktivität der COX aufgrund mitochondrialer DNA-Schäden stark eingeschränkt sein kann [Letellier et al. 1994]. Bei Experimenten an Mäusen mit einem Defekt im Kupferstoffwechsel hatte bereits eine Abnahme der Enzymaktivität um 50% eine starke Einschränkung des muskulären Energiehaushalts zur Folge [Kuznetsov et al. 1996 a]. So kann die COX dank ihrer übermäßigen Kapazitäten beim Vorliegen heterogener Mitochondrien-DNA mit nur einem geringen Anteil an „normaler“ mitochondrialer DNA Einschränkungen der Enzymaktivität bis zu einem gewissen Level gut kompensieren [Letellier et al. 1994, Rossignol et al. 2003]. Die COX-Übermaßaktivität variiert auch

von Gewebe zu Gewebe [Gnaiger et al. 1998 b, c]. Bei Untersuchungen der Übermaßaktivität der COX basierend auf einer Hemmung des Enzyms mit dem natürlicherweise im Körper vorhandenen NO (Stickstoffmonoxid) zeigte sich noch eine andere mögliche Bedeutung der hohen COX-Aktivität: NO hat in der Zelle eine Vielzahl an Funktionen, unter anderem die Regulation der mitochondrialen Atmung über eine Inhibition der COX. Dank deren Übermaßaktivität benötigt es relativ hohe Konzentrationen an NO, um die Atmungskette herunterzuregulieren. Auf diese Weise schützt sie die mitochondriale Funktion auch bei den im Rahmen von Stoffwechselvorgängen auftretenden hohen NO-Konzentrationen vor einer zu starken Hemmung durch NO [Antunes et al. 2004]. Allerdings gibt es in vivo-Studien an intakten menschlichen Zellen aus unterschiedlichen Geweben (z.B. Muskel), die zeigen, dass eine geringe Inhibition der COX in vivo bereits beim Vorliegen nur kleiner Anteile an mutierter mitochondrieller DNA zu einem starken Abfall der Atmungsrate führen können, insbesondere bei einem parallelen Elektronenfluss über die Komplexe I und II, und so z.B. schwere Myopathien hervorrufen können [D´Aurelio et al. 2001; Kunz et al. 2000; Villani et al. 1998; Villani und Attardi 1997]. Das legt die Vermutung nahe, dass die Übermaßkapazität der COX in vivo nur sehr gering ausgeprägt ist und die in isolierten Mitochondrien bestimmte hohe Atmungsrate des Komplexes IV ein Artefakt bedingt durch Verluste an Metaboliten während der Präparation auf der einen und einem übermäßigen Angebot an Substraten während der Messung auf der anderen Seite sein könnte. Auch der abgebrochen Kontakt zum Zytoskelett und zu den anderen Zellorganellen könnten hierbei eine Rolle spielen [D´Aurelio et al. 2001; Kunz et al. 2000; Villani et al. 1998; Villani und Attardi 1997]. Zusammenfasssend decken sich die hier erhobenen Ergebnisse für die Übermaßatmungsaktivität des Komplex IV aus mechanisch permeabilisierten Leberbiopsien der Maus mit den in der Literatur beschriebenen Werten. Die signifikant höhere Atmung des Komplex IV der OP 27 °C-Gruppe gegenüber der OP 37 °C-Gruppe könnte als Hinweis auf eine Schädigung des Komplex IV bedingt durch Temperaturunterschiede während der Operation gesehen werden. Allerdings sind unter Berücksichtigung der zitierten Studien, die eine Übermaßaktivität der COX in vivo widerlegen, die hier gewonnenen Ergebnisse kritisch zu betrachten, vor allem hinsichtlich der Übertragung auf in vivo-Verhältnisse. Insofern ist es schwierig zu sagen, inwiefern es sich bei den hier erhaltenen Werten für die COX-Aktivität lediglich um durch die Versuchsbedingungen selbst artifiziell veränderte Resultate handelt, oder ob in vivo tatsächlich eine Verletzung des Komplex IV vorliegt.

4.3. Messung der mitochondrialen Atmung bei unterschiedlichen Temperaturen im Oxygraphen

Wie bereits im Material und Methoden-Teil erläutert, haben wir zur Einarbeitung in die Methodik Voruntersuchungen von Mäuseleberbiopsien bei Temperaturen von 30 °C in der Messkammer des Oxygraphen vorgenommen. Da in der Literatur keine eindeutige Empfehlung für die optimale Temperatur zur Bestimmung der Atmungsaktivität im Oxygraphen ausgesprochen wird, entschieden wir uns aber aufgrund der Überlegung, das Milieu für die Mitochondrien so physiologisch wie möglich zu gestalten, dafür, für die endgültigen Experimente eine Temperatur von 37 °C anzustreben, da hier das Temperaturoptimum der Enzyme warmblütiger Organismen in vivo liegt [Löffler und Petrides 2003]. In diesem Teil der Diskussion möchten wir uns nun dem Einfluss der verschiedenen in vitro-Temperaturen auf das Testergebnis widmen. Allerdings muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass die Protokolle vor allem in Bezug auf die Stimulation der Komplexe I und II und der bei den Voruntersuchungen nicht erhobenen Aktivitäten des Komplexes IV und der fehlenden Entkopplung mit FCCP voneinander abweichen. Im Allgemeinen gilt für die Enzymkinetik, dass bei einer Temperaturerhöhung um ca. 10 °C ein Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 2 erwartet wird [Löffler und Petrides 2003]. Das bedeutet für unsere Messungen, dass wir bei 37 °C im Oxygraphen etwas weniger als eine Verdoppelung der Atmungswerte erwarten. Betrachtet man nun die Mediane der erhaltenen Atmungsaktivitäten der OXYGRAPH 30 °C- sowie der beiden OP-Gruppen für die State 2-Atmung, so fällt auf, dass das OXYGRAPH 30 °C-Kollektiv mit einem Median von 4,4 pmol/(s*mg) im Vergleich zu den OP 27 °C-Tieren (Median 21,2 pmol/(s*mg)) fast um den Faktor 4,8 bzw. um den Faktor 3,5 im Falle der OP 37 °C-Mäuse (Median 15,4 pmol/(s*mg)) niedriger liegen. Damit übertrafen die erhaltenen Faktoren die erwartete Verdoppelung der Atmung. Diese Tatsache wurde auch durch die Kruskal-Wallis ANOVA on ranks und den Dunn´s Test unterstützt, die für die beiden OP-Gruppen einen signifikanten Unterschied zur OXYGRAPH 30 °C-Gruppe feststellen konnten. Dafür gibt es nun folgende mögliche Erklärungen: Zum einen kann dieser drastische Anstieg der Atmung bei 37 °C nicht alleine auf eine Erhöhung der Messtemperatur zurückgeführt werden, da der Faktor 2 von beiden OP-Gruppen deutlich übertroffen wird. Gleichzeitig muss aber bedacht werden, dass das Protokoll des OXYGRAPH 30 °C-Kollektivs nach der Gabe von Malat und Glutamat ja nun nur die State 2-Atmung des Komplexes I erfasst, während bei den OP 27 °C- und OP 37 °C-Tieren durch die zusätzliche Gabe von Succinat auch noch der Komplex II synchron zum Komplex I stimuliert wird. Betrachtet

man nun diese beiden Gegebenheiten zusammen, erklärt sich möglicherweise die festgestellte Diskrepanz zwischen den erwarteten und den tatsächlich erhaltenen Werten aus einem Zusammenspiel aus der Temperaturerhöhung auf der einen und der höheren Atmungsaktivität durch gleichzeitige Anregung der Komplexe I und II auf der anderen Seite. Auch in Bezug auf das Ansprechen auf ADP lässt sich ein signikanter Unterschied zumindest der OXYGRAPH 30 °C- und der OP 27 °C-Gruppen feststellen (Kruskal-Wallis ANOVA on ranks und Dunn´s Test). Hier ist allerdings der Unterschied der State 3-Atmung nicht so stark ausgeprägt; die Werte der OP 27 °C-Mäuse (Median 73,2 pmol/(s*mg)) liegen mit einer Erhöhung um den Faktor 2,4 nur leicht über den nach der Temperaturregel vorausgesagten Beträgen, während die OP 37 °C-Tiere (Median 60,6 pmol/(s*mg)) mit einem Verhältnis von 2,0 im Vergleich zur OXYGRAPH 30 °C-Gruppe (Median 30,0 pmol/(s*mg)) gut den Erwartungen entsprechen. Hier scheinen also entweder der Temperatureffekt oder die synchrone Stimulation der beiden Komplexe oder beide Effekte gleichzeitig nicht so stark ausgeprägt zu sein. Die Berechnung der RCR des Komplexes I (das Verhältnis der Atmung nach Gabe von ADP zur Atmung unter Malat und Glutamat; State 3:State 2) bei Temperaturen von 30 °C im OXYGRAPH-2k ergab einen Median von 7,3. Damit war die RCR des Komplex I nur knapp nicht signifikant höher als die RCR der Komplexe I und II unter ADP bei den beiden OP-Gruppen, deren Mediane beide bei etwa 3,4 lagen, da der durch die Kruskal-Wallis ANOVA on ranks ermittelte p-Wert mit 0,055 nur relativ knapp über dem Signifikanzniveau von 0,05 lag. Diese fast signifikante Differenz lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass sich die OXYGRAPH 30 °C- und die OP-Gruppen vor allem in der State 2-Atmung stark unterschieden (hier lagen die OP-Gruppen weit über den Erwartungen nach der Temperaturregel), während die Atmung unter ADP gut den Regeln der Temperaturerhöhung folgte. Das bedeutet aber auch, dass das Absinken der RCR nicht alleine durch die Enzymkinetik verusacht wird, da sich diese ja in gleichem Maße sowohl auf die State 2- als auch die State 3-Atmung ausgewirkt hätte. Die beobachteten Resultate könnten damit erklärbar sein, dass eventuell mit der Erhöhung der Temperatur eine vermehrte Entkopplung der beiden OP-Gruppen auftritt, die dann den stimulierenden Effekt des ADP begrenzt, da der Einfluss der ATP-Synthetase auf die Atmungsaktivität bei Entkopplung eingeschränkt ist. Auch in der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass es aufgrund einer Temperaturerhöhung zu einer vermehrten Entkopplung kommen kann, z.B. bei Lebermitochondrien des antarktischen Fisches Lepidonotothen nudifrons [Hardewig et al. 1999]. Die nach Injektion erhaltenen State 3c-Werte liegen im Median bei den OXYGRAPH 30 °C-Tieren bei 27,4

pmol/(s*mg), bei den OP 27 °C-Mäusen bei 91,9 pmol/(s*mg) und bei den OP 37 °C-Nagern bei 87,1 pmol/(s*mg). Damit liegen die OP-Gruppen beide um etwa den Faktor 3 (OP 27 °C: 3,4; OP 37 °C: 3,2) über dem OXYGRAPH 30 °C-Kollektiv. Damit ergibt sich für die beiden OP-Gruppen ein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis ANOVA on ranks und Dunn´s Test), der ebenfalls höher liegt, als es nur aufgrund der Temperaturregel angenommen werden würde. Die Untersuchung der Cytochrom c Control Ratio mittels Kruskal-Wallis ANOVA on ranks und Dunn´s Test, bei der der Anstieg auf die Gabe von Cytochrom c hin mit der Atmung unter ADP verglichen wird, ergab für die OP 37 °C-Gruppe einen signifikant höheren Wert (Median 1,4) bezogen auf die OXYGRAPH 30 °C-Tiere (Median 0,9), während der Nachweis eines solchen Unterschiedes für den Vergleich des OXYGRAPH 30 °C-Kollektivs mit der OP 27 °C-Gruppe (Median 1,2) nicht erbracht werden konnte. Die signifikant höhere Cytochrom c Control Ratio der OP 37 °C-Mäuse lässt sich wahrscheinlich nur auf die bedeutend ausgeprägtere Reaktion der OP 37 °C-Tiere auf das Cytochrom c hin erklären, da beim Vergleich der Anregung durch das ADP kein Unterschied zwischen den beiden Kollektiven festgestellt werden konnte. An dieser Stelle wird auch nochmals deutlich, dass die OP 37 °C-Tiere wesentlich stärker auf die Stimulation durch Cytochrom c ansprechen als die OP 27 °C-Tiere, da es hier trotz signifikanter Unterschiede sowohl in Bezug auf die Atmung unter ADP als auch der Stimulation durch Cytochrom c im Vergleich zur OXYGRAPH 30 °C-Gruppe nicht zu einer signifikant höheren Cytochrom c Control Ratio kommt. Als mögliche Erklärung für diese Erkentnisse kommt nun neben der Enzymkinetik noch hinzu, dass bei der Existenz des vermuteten Cytochrom c-Transport-Mechanismuses der Miotchondrien dieser bei höheren Temperaturen möglicherweise auch besser arbeiten und so zu einem stärkeren Ansprechen der beiden OP-Gruppen auf Cytochrom c hin führen könnte, sodass sich der Temperatureffekt hier nicht nur auf die Enzyme der einzelnen Komplexe, sondern auch auf die des Transportmechanismuses ausweiten ließe. In diesem Fall gibt es also mit Struktur des Protokolls und der Enzymkinetik sowohl der Komplexe als auch des vermuteten Cytochrom c-Transportmechanismuses schon drei mögliche Ursachen für den bemerkenswerten Unterschied der beiden OP-Gruppen im Vergleich zum OXYGRAPH 30 °C-Kollektiv. Betrachtet man nun die RCR des Komplex I unter Cytochrom c (OXYGRAPH 30 °C; Median 6,2) und die RCR der Komplexe I und II unter Cytochrom c (OP 27 °C; Median 4,3 bzw. OP 37 °C; Median 4,8), so kann die Kruskal-Wallis ANOVA on ranks zwischen den einzelnen Gruppen keine bedeutsame Differenz nachweisen. Dieser Umstand lässt sich eventuell damit begründen, dass die beiden OP-Gruppen zwar sowohl nach Stimulation mit Cytochrom c

als auch bei der Atmung unter Malat, Glutamat und Succinat statistisch signifikant höhere Werte haben, sich diese Unterschiede aber bei der Bildung der Quotienten letztlich wieder relativieren. Wird nun bei der OXYGRAPH 30 °C-Gruppe nach Hemmung des Komplex I mittels Rotenon der Komplex II durch das Hinzufügen von Succinat in die Kammer stimuliert, so gibt der gemessene O_2-Verbrauch die Aktivität des Komplex II unter Cytochrom c (dieses befand sich ja bereits vor der Stimulation mit Succinat im Medium) wieder. Dieser Betrag lag bei den OXYGRAPH 30 °C-Messungen im Median bei 61,6277 pmol/(s*mg). Da wir auch hier keinen Einzelwert für den Komplex II bei den OP-Mäusen zur Verfügung hatten, benutzten wir bei den OP-Kollektiven erneut die Atmung der Komplexe I und II nach Substitution von Cytochrom c als Pendant. Diese lagen im Median bei 91,8534 pmol/(s*mg) (OP 27 °C) und 87,0993 pmol/(s*mg) (OP 37 °C). Die zur Auffindung etwaiger Unterschiede angewendete Kruskal-Wallis ANOVA on ranks ergab für keine der Gruppen ein signifikantes Ergebnis. Allerding ist es interessant, dass der Komplex II der OXYGRAPH 30 °C-Gruppe alleine zwar von den Werten her stets unter der Atmungsaktivität der Komplexe I und II der OP-Tiere liegt, sich hier aber kein signifikanter Unterschied zeigt, und dieses trotz höherer Temperatur in der Kammer, denn die OP 27 °C-Tiere lagen lediglich um den Faktor 1,5 über den OXYGRAPH 30 °C-Mäusen; bei den OP 37 °C-Nagern betrug dieser Faktor 1,4. In der Literatur ist die Messung der mitochondrialen Atmung im Oxygraphen bei unterschiedlichen Temperaturen vor allem auf dem Gebiet der Untersuchung der Anpassung verschiedener Organismen an widrige Umweltbedingungen von Interesse [Almeida-Val et al. 1994; Birkdale und Gesser 2003; Irving und Watson 1976; Weinstein und Somero 1998]. Dabei steht vor allen Dingen die Bedeutung der Mitochondrien für die Akklimatisation der Lebewesen an extreme Umgebungstemperaturen, wie z.B. tropischer [Irving und Watson 1976] oder antarktischer Fische [Weinstein und Somero 1998], im Mittelpunkt. Diese und andere Wasserlebewesen greifen bei der Anpassung an Temperaturveränderungen auf ATP-verbrauchende Stoffwechselleistungen (z.B. Produktion von Eiweißen und Gluconeogenese) zurück [Glanville und Seebacher 2006]. Untersuchungen an isolierten Mitochondrien aus Leber und Herz des Krokodils bei 20, 25 und 30 °C im Oxygraphen ergaben für die State 3-Atmung des Komplex I (Malat, Pyruvat und ADP im Untersuchungsmedium) einen Anstieg der Atmungsaktivitäten mit der Temperatur [Glanville und Seebacher 2006]. Diese Ergebnisse sind insofern mit den von uns erhobenen Werten konform, als dass auch wir einen Anstieg der gekoppelten Atmung mit ATP-Synthese der OXYGRAPH 30 °C-Messungen im Vergleich zu den beiden OP-Gruppen feststellen konnten, immer unter der Einschränkung, dass bei den OP-Mäusen die

Komplexe I und II gleichzeitig stimuliert wurden, während bei der OXYGRAPH 30 °C-Gruppe nur über Komplex I Elektronen in das ETS eingespeist wurden. Im Rahmen von Experimenten an Herzmitochondrien aus Triplefin-Fischen mit einem parallelen Elektronenfluß über die Komplexe I und II (Malat, Glutamat und Succinat) bei Temperaturen von 15, 25 und 30 °C im Oxygraphen konnten Hilton et al. ebenfalls nach Zugabe von ADP einen Abfall der RCR (State 3-Atmung:State 2-Atmung) mit zunehmender Temperatur feststellen. Diese Beobachtung erklärten sie sich damit, dass der Transport des Glutamats in die mitochondriale Matrix vom Membranpotential abhängig ist, das seinerseits mit der Temperatur abnimmt. Daher kommt es bei Temperaturerhöhung zu einer Abnahme des Elektronenflusses über den Komplex I, was dann zu einem Abfall der RCR führt [Hilton et al. 2010]. Übertragen auf unsere Ergebnisse findet sich damit nun auch eine weitere mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass die RCR des Komplex I unter ADP bei Temperaturen im Oxygraphen von 30 °C tendenziell höher liegt als die RCR unter ADP der Komplexe I und II gemeinsam bei 37 °C im Oxygraphen, da es auch bei unseren Mäuselebern eventuell zu einer Absenkung des Flusses der Elektronen über den Komplex I mit einem Anstieg der Temperatur kommen könnte. Zusammenfassend ist der Aufbau des Protokolls für die Aussagekraft der Messergebnisse wesentlich bedeutender als die Temperatur in den Kammern. Hier liegt wahrscheinlich der einzige Vorteil einer Temperatur von 37 °C darin, dass sie eher der physiologischen Situation entspricht. Allerdings muss bedacht werden, dass die Proben zwischenzeitlich im Kühlschrank heruntergekühlt und erst im Oxygraphen wieder erwärmt wurden, wodurch bereits Artefakte entstehen können. Es ist also letztlich fraglich, ob die Temperatur im Oxygraphen eine große Rolle spielt, oder ob sie nicht vernachlässigbar ist, solange sie nicht so niedrig ist, dass die Enzyme nicht mehr arbeiten, oder so hoch (> 40 °C), dass sie denaturieren [Löffler und Petrides 2003]. Dennoch wäre es interessant, diesen Versuch noch einmal mit identischen Protokollen für alle Kollektive zu wiederholen.

4.4. Grenzen der Methode

Wie jede wissenschaftliche Untersuchungsmethodik hat auch die Untersuchung von Mitochondrien aus permeabilisierten Gewebeproben der Leber im OXYGRAPH-2k ihre Grenzen. Dies beginnt schon bei der Präparation der kleinen Leberbiopsien. Hierbei ist es wichtig, möglichst viel Parenchym und wenig kapsuläres Bindegewebe zu gewinnen, da im Letzteren weniger Mitochondrien enthalten sind als im für die Syntheseleistung verantwortlichen Parenchym, wo die Zellorganellen besonders zahlreich vertreten sind [Lüll-

mann-Rauch 2003]. Ist der Anteil des Kapselgewebes in der Probe zu groß, kommt es zur Verfälschung der Messung, da relativ zur Masse weniger Organellen vorhanden sind, was dann eine geringere Atmungsaktivität des Gewebes vorspiegelt. Auch muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass die zur Stimulation oder Hemmung hinzugefügten Substrate im Überschuss gegeben werden mussten, da die genauen benötigten Mengen bis dato unbekannt sind und einer verminderten Wirkung bedingt durch Unterdosierung vorgebeugt werden sollte [Gnaiger 2008 c]. Dies bedeutet aber vor allem bei der Stimulation der Komplexe mit Malat, Glutamat, Succinat und ADP sowie beim Cytochrom c-Test starke Einschränkungen beim Nachempfinden der physiologischen Verhältnisse. Dies betrifft auch die in unseren Experimenten verwendeten hohen O_2-Partialdrücke von bis zu 400 nmol/ml, die um ein Vielfaches höher liegen als die unter in vivo-Verhältnissen von 3-30 µM [Murphy 2009]. Auch ist die O_2-Konzentration abhängig vom physiologischen State des Mitochondriums und dem mit dem Blut zum Mitochondrium transportierten O_2 und unterliegt aufgrund des Konsums durch die COX selbst starken lokalen Schwankungen [Murphy 2009]. All diese unterschiedlichen Faktoren können im Oxygraphen nicht den biologischen Verhältnissen entsprechend nachempfunden werden, was eine Einschränkung der Übertragbarkeit darstellt. Dadurch schaffen wir möglicherweise vor allem für Enzyme wie die COX optimalere Bedingungen als die, die in einer intakten Zelle herrschen, was dann die Übertragungsfähigkeit unserer Ergebnisse auf die Situation im lebenden Organismus einschränkt [Villani und Attardi 1997]. Auch werden in unseren Experimenten die Gewebeproben mechanisch permeabilisiert, so dass wir keinerlei Aussage mehr darüber treffen können, inwiefern die Kontakte der Mitochondrien zum Zytoskelett und den anderen Zellorganellen erhalten geblieben sind. Dadurch ist es anhand unserer Versuche nicht möglich, ihre Interaktion mit diesen und die Beeinflussung der Mitochondrien durch die anderen Organellen zu beurteilen. Dass dies bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden sollte, wird in der Literatur, besonders bei der Untersuchung der Regulation der mitochondrialen Atmung [Saks et al. 1998], häufig bestätigt. So gibt es z.B. bezüglich der Reaktion von Mitochondrien aus Säugetierherzen schwankende Angaben über ihre Affinität gegenüber ADP, je nach dem, ob isolierte Mitochondrien oder Mitochondrien aus gehäuteten Fasern mit intakter äußerer Membran und erhaltenen Kontakten zum Zytoskeltett vorliegen [Birkdale und Gesser 2003]. Auch ist das Verhalten von Mitochondrien in vitro und in vivo nach Stimulation mit ADP unterschiedlich. Es wird vermutet, dass es eine Gruppe von extramitochondrialen, zytoplasmatischen Proteinen geben soll, die die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran für ADP

regulieren und damit Einfluss auf die ATP-Synthese nehmen [Kuznetsov et al. 1996 b; Saks et al. 1998; Saks et al. 1995; Saks et al. 1994; Saks et al. 1993]. Auch weisen Phantom-Kardiomyozyten, die lediglich Mitochondrien und das Zytoskelett, aber kein Zytoplasma mehr enthalten, nach Stimulation mit ADP das selbe Verhalten auf wie permeabilisierte Zellen [Saks et al. 1998], und die Behandlung gehäuteter Muskelfasern mit Trypsin erniedrigt die Permeabilität der äußeren Membran für ADP [Saks et al. 1995]. Daraus schlossen Saks et al., dass dieser regulierende Proteinfaktor mit dem Zytoskelett assoziiert sein muss und beim Isolierungsvorgang verloren geht, was die äußere Membran vollkommen durchlässig für ADP macht [Saks et al. 1998; Saks et al. 1995; Saks et al. 1994]. Ein anderes Beispiel für die Interaktion der Mitochondrien mit dem Zytoskelett stellen die von Leterrier et al. entdeckten Interaktionen zytoskelettärer Mikrotubuli und Neurofilamente, die an Proteinen auf der Oberfläche der äußeren Membran von Gehirnmitochondrien inserieren, dar [Leterrier et al. 1994]. Die komplexen Feedback-Regelkreisläufe, bei denen das Mitochondrium auf das Zytoplasma angewiesen ist, können in permeabilisierten Zellen ebenfalls nicht untersucht werden [Saks et al. 1998]. Diese Faktoren werden bei in vitro-Versuchen an isolierten Mitochondrien nicht berücksichtigt und bilden eine weitere Einschränkung bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die zellulären in vivo-Verhältnisse und den gesamten Organismus. Ein anderer Punkt ist der, dass wir keine Information darüber haben, ob sich die Morphologie der Mitochondrien bei der mechanischen Permeabilisierung verändert, denn zumindest beim herkömmlichen Verfahren, Mitochondrien zu isolieren, kommt es aufgrund des Isolationsmediums auch innerhalb des Organelles zu einer Veränderung der Kontakte zwischen der inneren und der äußeren Membran [Saks et al. 1994]. Dieses ist bei unserer Methode zwar eher unwahrscheinlich, da wir auf die Mitochondrien oder Zellen angreifende Chemikalien verzichten, aber es wäre interessant, die Mitochondrien aus mechanisch permeabilisierten Geweben z. B. noch mittels Elektronenmikroskop zu untersuchen, um eine intakte Morphologie nachzuweisen, denn wie schon bei der Auswertung des Cytochrom c-Tests festgestellt, kann man mit dieser Methode darüber keine sicheren Angaben machen. Ebenfalls ist es wahrscheinlich, dass bei dieser Art der Präparation auch einige Mitochondrien selbst zu Schaden kommen. Bei der Isolierung von Mitochondrien z.B. werden allein schon durch den Isolierungsvorgang selbst 90 % der Mitochondrien zerstört, so dass im Nachhinein nicht mehr bestimmt werden kann, welcher Mitochondrienpopulation die erhaltenen Organellen letztlich angehören [Saks et al. 1994]. Dies ist auch einer der Hauptvorteile der Untersuchung permeabilisierter Gewebeproben, da mit diesem Verfahren auch die oftmals nur sehr geringen zur Verfügung stehenden Ge-

webeproben, z.B. aus Biopsien, verarbeitet werden können [Saks et al. 1994; Saks et al. 1998]. Da es allerdings für keine der beiden Methoden Aussagen über den Anteil der durch das jeweiligen Verfahren selbst beschädigten Mitochondrien gibt, gibt es zur Zeit keinerlei Grundlagen zur Beurteilung, welche von ihnen in Bezug auf diesen Aspekt größere Artefakte durch die Gewebeverarbeitung selbst hervoruft. Abschließend muss also bei der Interpretation aller hier vorliegenden Ergebnisse bedacht werden, dass sich mit dieser Methode nur Aussagen über die Mitochondrien auf zellulärer Ebene machen lassen, nicht jedoch über den gesamten Organismus.

4.5. Schlussfolgerung

Die ersten beiden Fragen, die mit dieser Arbeit beantwortet werden sollten, sind die, ob sich anhand mechanisch permeabilisierter Leberbiopsien der Maus die mitochondriale Funktion charakterisieren lässt und ob eine zusätzliche chemische Permeabilisierung notwendig oder sogar schädlich ist. Die erste Frage lässt sich mit ja beantworten, bei Experimenten an mechanisch permeabilisierten Leberbiopsien im OXYGRAPH-2k kommt es nach Stimulation der Mitochondrien mit Substraten zu einer deutlichen Reaktion, die sich auch durch die Applikation von Digitonin nicht steigern lässt. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Methode genauso gut zur Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran geeignet ist, wie das chemische Verfahren mit Digitonin. Was die Frage nach einer zusätzlichen chemischen Permeabilisierung betrifft, so hat das ausschließlich mechanische Vorgehen gegenüber dem herkömmlichen Verfahren mit Chemikalien den Vorteil, dass sich so Nebenwirkungen, wie Schäden durch die lange Lagerung des Gewebes oder das Angreifen auch der mitochondrialen Membran durch die Chemikalie, verhindern lassen. Ein weiterer angenehmer Nebeneffekt ist der, dass bei dem manuellen Zerpflücken der Gewebeproben die Kosten für permeabilitätserhöhende Chemikalien wegfallen, so dass man also sagen kann, dass eine zusätzliche Permeabilisierung der Gewebeproben nicht notwendig ist, sondern eher schädigenden Einfluss hätte. Bei der Untersuchung der Temperatureffekte mit dem mechanischen Verfahren stellte sich allerdings heraus, dass es einen Aspekt gibt, der noch weiterer Untersuchungen bedarf, nämlich der, dass die Anwendung dieses Verfahrens bei Mäuselebern möglicherweise Artefakte in Form einer falsch hohen mitochondrialen Funktion hervorruft. Dies zeigte sich bei den hier vorliegenden Messungen besonders stark bei der Applikation von FCCP; hier war die Reaktion der Atmungsaktivität der Maus wesentlich ausgeprägter als die von Schweinelebern, bei denen das mechanische Verfahren angewendet worden war. Dieses Phänomen sollte noch einmal in gesonderten Experimen-

ten verifiziert werden. Die nächste Frage, die mit dieser Arbeit beantwortet werden sollte, war die, inwiefern sich Änderungen der Körpertemperatur auf die mitochondriale Funktion auswirken. Da bei jeder Analyse der mitochondriellen Funktion ein gut strukturiertes Substrat-Inhibitor-Protokoll die Voraussetzung für eine hohe Qualität und Aussagekraft der gewonnen Ergebnisse darstellt, wurde im ersten Teil der Diskussion der Temperatureffekte zuerst das Protokoll charakterisiert, bevor anschließend näher auf die Temperatureffekte selbst eingegangen wurde. Die hervorstechendsten Eigenschaften, die das angewandte Protokoll besonders dazu qualifizieren, die Mitochondrien der Maus zu untersuchen, sind folgende: Die synchrone Stimulation der Komplexe I und II der Atmugskette gleichzeitig durch die parallele Gabe von Malat, Glutamat und Succinat ist gemäß dem aktuellen Stand der Forschung die beste Möglichkeit, den Elektronenfluss auf die Elektronentransportkette so physiologisch wie möglich nachzuempfinden. Damit kommen die resultierenden Ergebnisse den wahren Verhältnissen näher als mit den herkömmlichen Protokollen, die die Einspeisung der Elektronen über die Komplexe I und II isoliert voneinander erforschen. Ein anderes Merkmal des Protokolls war die Verwendung von Cytochrom c zu Überprüfung der Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran. Dieser weitverbreitete Test basiert auf der Annahme, dass Cytochrom c unbeschädigte Membranen nicht überwinden kann und somit ein Anstieg der Atmungsaktivität auf die Gabe dieser Substanz hin einen Hinweis darauf darstellt, dass eine Beschädigung der Membran vorliegt und der Atmungsanstieg auf eine Substitution des aufgrund der defekten äußeren Membran freigesetzten Cytochrom c zurückzuführen ist. Die von uns beobachteten signifikanten Anstiege des O_2-Verbrauchs auf die Applikation des Cytochrom c hin, dessen Ausprägung sich in den beiden Gruppen signifikant untschied, könnten als Hinweis gesehen werden, dass tatsächlich ein Membranschaden vorgelegen hat, der bei den OP 37 °C-Tieren (sie wiesen ein stärkeres Ansprechen als ihre OP 27 °C-Pendants auf) größer ausgeprägt ist als bei den OP 27 °C-Tieren. Allerdings findet man in der Literatur einige Anhaltspunkte, die dafür sprechen, dass im speziellen Fall der Maus die Reaktion auf das Cytochrom c hin auch auf einen bis dato unbekannten Transportmechanismus zurückzuführen sein könnte, der es den Mitochondrien erlaubt, diese Substanz über die Membran hinweg aufnehmen zu können. In diesem Falle wären die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven möglicherweise lediglich auf eine gesteigerte Enzymkinetik des Tranportprozesses oder der Enzyme der Atmungskette bei höheren Temperaturen zurückzuführen. In Anbetracht dieser Vermutungen ließe die Reaktion auf das Cytochrom c hin keinerlei Rückschlüsse auf die Versehrtheit der äußeren Mitochondrienmembran zu. Da man mit den hier vorgestellten Experimenten eine

solche These nicht beweisen kann, sollte die Untersuchung dieses Sachverhaltes Gegenstand zukünftiger Forschungen an Mitochondrien werden. Ein weiterer wichtiger Punkt im verwendeten Protokoll ist die Titrierung des Entkopplers FCCP. Wie sich bei der Analyse der Temperatureffekte herausstellte, trifft im Falle der Mitochondrien aus der Mäuseleber die weitverbreitete These, die maximale Atmungsaktivität der Mitochondrien könne nur unter ADP verzeichnet werden, nicht zu. Die hier bestimmte Atmungsaktivität unter ADP betrug bei beiden Gruppen lediglich 43 % der erreichten Werte nach Entkopplung. Damit liegt die Vermutung nahe, dass bei der Bestimmung der mitochondriellen Atmung der Maus im Gegensatz zu z.B. dem Schwein, bei dem eine Entkopplung keinerlei Effekte zeigt, in Zukunft immer ein Entkoppler gegeben werden sollte, um die maximalen Kapazitäten des ETS bestimmen zu können. Die Bedeutung der starken Reaktion auf den Entkoppler könnte darin liegen, dass bei den Mäusen entweder die Hemmung durch die ATP-Synthetase sehr viel höher ist als bei anderen Tierarten, oder darin, dass die Maus über höhere Reserven zur schnellen Steigerung der ATP-Produktion im Bedarfsfall verfügt. Allerdings sind auch artifiziell hohe Reaktionen auf FCCP bedingt durch die mechanische Permeabilisierung nicht auszuschließen, so dass es interessant wäre, zur genaueren Untersuchung dieser Phänomene in Zukunft weitere Experimente durchzuführen. Die Bearbeitung des Vergleichs der OP 27 °C-Tiere mit den OP 37 °C-Tieren zeigte außer den oben bereits erwähnten Unterschieden in den beiden Gruppen lediglich noch eine Differenz der Kollektive bezüglich der isoliert von den Komplexen I-III und V bestimmten Atmungsaktivität des Komplexes IV, der Cytochrom c Oxidase. Dieses Enzym, das die über das ETS geleiteten negativen Ladungen auf elementares O_2 übertägt, wies bei der von den anderen Komplexen unabhängigen Untersuchung einen O_2-Verbrauch auf, der bei beiden Kollektiven den der maximalen Kapazität aller Komplexe zusammen unter FCCP um den zweifachen Wert überstieg. Aus diesem Ergebnis lässt sich nun die Vermutung ableiten, dass die COX über eine Übermaßkapazität verfügt, für deren Erklärung eine Vielzahl an Möglichkeiten in Betracht kommt. So wird in der Literatur dafür häufig die These herangezogen, dass auf diese Weise bis zu einem gewissen Schwellenwert große Mengen an defekten Enzymen aufgrund mutierter mitochondrialer DNA kompensiert werden können, oder dass diese Übermaßaktivität nötig sei, um bei den in den Zellen herrschenden niedrigen O_2-Partialdrücken noch eine ausreichend hohe O_2-Bindungskapazität gewährleisten zu können. Auch ließ sich hier ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen im O_2-Verbrauch verzeichnen, da die OP 27 °C-Tiere bei Werten von 352,2 pmol/(s*mg) und die OP 37 °C-Tiere bei 301,9 pmol/(s*mg) lagen. Das könnte ein Anhalt dafür sein, dass die COX der

OP 37 °C-Tiere während der Operation einen stärkeren Schaden erlitten haben könnte. Allerdings muss man auch hier die Interpretation der Ergebnisse kritisch betrachten, da die Bedeutung, und vor allem die einer tatsächlichen Übermaßkapazität der COX in vivo, in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Alle anderen angestellten Vergleiche der Atmungsaktivitäten in Abhängigkeit der Gabe eines Substrats bzw. Inhibitors hatten keinerlei signifikante Unterschiede zum Ergebnis. Insgesamt betrachtet muss aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten der Schluss gezogen werden, dass Schwankungen der Körpertemperatur der Maus, z.B. während einer Operation, lediglich geringe Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion zu haben scheinen. Der letzte Teil der Fragestellung beschäftigte sich damit, inwiefen die in vitro-Temperatur während der Messungen im Oxygraphen das Testergebnis beeinflusst. Die einzige wirklich interessante Beobachtung dieses Versuchsteils war, dass die RCR des Komplex I unter ADP bei der OXYGRAPH 30 °C-Gruppe tendenziell höher liegt als die RCR unter ADP der Komplexe I und II bei Messungen bei 37 °C im Oxygraphen (OP-Gruppen). Dieser Unterschied war bei einem Signifikanzniveau von 0,05 mit einem p-Wert von 0,055 annähernd signifikant. Dieses Absinken der RCR bei höheren Temperaturen könnte auf mehrere mögliche Ursachen zurückzuführen sein: Zum einen könnte es bei den beiden OP-Gruppen aufgrund der höheren Umgebungstemperatur zu einer Entkopplung gekommen sein, die dann den stimulierenden Effekt des ADPs auf die Atmungskette verminderte. Zum anderen könnte die Abnahme der Temperatur über eine Erniedrigung des Matrixpotentials eine Hemmung des Glutamattransports in das Mitochondrium verursachen, was sich dann indirekt in Form einer geringeren Atmungsaktivität des Komplex I niederschlägt. Insgesamt betrachtet scheint angesichts der hier vorliegenden Ergebnisse die Messtemperatur im Oxygraphen im Vergleich zum verwendeten Messprotokoll keine besondere Auswirkung auf das Ergebnis zu haben. Der einzige mögliche Vorteil der Messung bei 37 °C ist der, dass hierbei die optimalen Bedingungen für die Enzymkinetik geschaffen werden. Eine Verfälschung dieser Ergebnisse aufgrund des zwischenzeitlichen Abkühlens der Proben bei der Lagerung und der Verarbeitung kann allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden. Daher wäre zur wirklich sicheren Abklärung etwaiger Temperaturunterschiede im Oxygraphen eine Messung mit dem gleichen Messprotokoll sowie sofortiger Preparation der Proben ohne kurzzeitige Kühlung nötig.

5 Zusammenfassung

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass es z.B. bei Sepsis zu Störungen der mitochondrialen Bioenergetik kommt. Da in der Sepsis-Forschung häufig Mäuse als Tiermodell eingesetzt werden, etablierten wir die bisher nur bei Schweinen angewendete mechanische Permeabilisierung als neue Methodik zur Untersuchung von Mitochondrien aus kleinen Leberbiopsien der Maus. Ein Vorteil des Verfahrens ist, dass so noch ausreichende Organmengen für weitere Versuche erhalten bleiben. In Experimenten hat sich gezeigt, dass Mäuse bei der Anästhesie rasch auskühlen, wodurch Verfälschungen der Ergebnisse möglich sind. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit mit der Untersuchung von Temperatureffekten auf die mitochondriale Atmung. Es wurden 30 Mäuse während einer Vollnarkose (Midazolam/Ketamin) einer medianen Laparotomie mit anschließender Schmerz- und Antibiotikatherapie (Clindamycin/Ceftriaxon) unterzogen. Sie waren in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Körpertemperatur der OP (Operation) 37 °C (Grad Celsius)-Gruppe wurde mittels Wärmesystem konstant auf 37 °C gehalten, während bei der OP 27 °C-Gruppe der Abkühlung nicht entgegengewirkt wurde. Hier war ein Abfall auf bis zu 27° C zu verzeichnen. 16 Stunden nach dem Eingriff wurden die Tiere tracheotomiert, intubiert und beatmet, dann wurden sie per Blutentnahme aus der Vena cava inferior und Thorakotomie getötet. Nach Gewinnung der Leberbiopsie wurde das Gewebe mit Pinzetten mechanisch permeabilisiert, wodurch nach Zerstörung der Zellmembranen die Mitochondrien frei vorlagen**.** Zur Analyse der mitochondrialen Atmung im OXYGRAPH-2k wurde ein Substrat-Inhibitor-Protokoll verwendet, dessen Prinzip darauf beruht, die Komplexe der Atmungskette erst gezielt zu stimulieren, um sie dann mit spezifischen Inhibitoren zu hemmen. Über den resultierenden Effekt auf die Atmung lässt sich auf die Bedeutung des Komplexes für die Mitochondrienfunktion schließen. Bei der Untersuchung der Mitochondrien einer Spezies ist der Aufbau des Protokolls wichtig, um die Komplexe zu analysieren. Darum stand hier dessen Beschreibung und seine Eignung besonders für die Maus im Zentrum. Im Rahmen der Arbeit testeten wir die im Vergleich zur bisher üblichen chemischen Permeabilisierung mit Digitonin schnellere und artefaktärmere mechanische Methode, um Gewebeproben zu verarbeiten und die Organellen den Substraten zugänglich zu machen. Wie die geringe Reaktion der mechanisch permeabilisierten Organellen auf Digitonin hin zeigt, bietet die Methode eine gute Alternative zum chemischen Verfahren. Zum Vergleich der Temperaturgruppen wurde ein Mann-Whitney-Rangsummentest durchgeführt, während die Feststellung signifikanter Reaktionen auf ein Substrat innerhalb einer Gruppe

durch den Wilcoxon-Rangtest erfolgte. Ein Ergebnis war der starke Anstieg der Atmung auf die Entkopplung mit FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) im Vergleich zur maximalen gekoppelten Atmung unter ADP. Dies könnte entweder bedeuten, dass die Hemmung durch die ATP-Synthetase sehr hoch ist, oder dass Mäuse über große Reserven zur raschen Steigerung der ATP-Produktion verfügen. Allerdings sind auch artifiziell hohe Reaktionen bedingt durch die mechanische Permeabilisierung nicht auszuschließen, da sich beim Schwein kein solcher Effekt auf FCCP einstellt. Zur Überprüfung der äußeren Membran wurde Cytochrom c gegeben (Cytochrom c-Test), was eine signifikante Steigerung des Sauerstoffverbrauchs mit deutlichem Unterschied zwischen den Kollektiven zum Resultat hatte. Es wird angenommen dass das Cytochrom c nur als Vorläuferprotein ins Mitochondrium gelangen kann. Die Reaktion könnte bedeuten, dass ein Membranschaden vorgelegen hat, der bei den OP 37 °C-Tieren größer ausgeprägt war. Jedoch gibt es in der Literatur Anhalt dafür, dass Mäuse über Transporter verfügen könnten, um Cytochrom c von außen ins Mitochondrium aufzunehmen. Dann ließe dieser Test keine Aussage über die Intaktheit der Membran zu und die Unterschiede könnten der temperaturabhängigen Enzymkinetik geschuldet sein. Die isolierte Messung der COX (Cytochrom c Oxidase) ergab überall eine Verdopplung der Atmung relativ zur Entkopplung, wobei die Werte der OP 27 °C-Tiere signifikant höher lagen. Das lässt sowohl eine Übermaßaktivität als auch eine größere Beschädigung der COX der OP 37 °C-Gruppe vermuten. Eine Eigenschaft des Protokolls ist, dass durch die simultane Gabe von Malat, Glutamat und Succinat Komplex I und II parallel über das Ubiquinon Elektronen in das Electron Transport System (ETS) einspeisen. Damit wird es den natürlichen Bedingungen gerechter als herkömmliche Protokolle. Der letzte Teil widmete sich dem Einfluss der Oxygraphentemperatur während der Messung. Hierfür wurden mittels Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance (ANOVA) on Ranks mit folgendem Dunn´s Test die Ergebnisse der OP 27 °C- und 37 °C-Gruppen, die bei 37 °C in den Kammern untersucht wurden, mit Messungen bei 30 °C im Oxygraphen verglichen. Es zeigte sich ein Absinken der RCR (Respiratory Control Ratio) der Komplexe I und II der OP-Kollektive gegenüber der Messung bei 30 °C. Dies könnte ein Hinweis auf eine vermehrte Entkopplung bei Erwärmung sein. Zusammengefasst bietet also die mechanische Methode eine gleichwertige Alternative zur Permeabilisierung mit Digitonin, ferner sollte bei Mäusen FCCP zur Erfassung der maximalen ETS-Kapazität gegeben und die Aussage des Cytochrom c-Tests kritisch hinterfragt werden. Bei der OP 37°C-Gruppe könnte eine Beschädigung der COX vorliegen. Ein Temperaturanstieg im Oxygraphen könnte zu einer vermehrten Entkopplung führen.

6 Literaturverzeichnis

1. Agarwal A, Goggins WC, Pescovitz MD, Milgrom ML, Murdock P, Fridell JA: Comparison of histidine-tryptophan ketoglutarate and University of Wisconsin solutions as primary preservation in renal allografts undergoing pulsatile perfusion. *Transplant Proc 37: 2016-2019 (2005)*
2. Allgeyer MH: Induzierte Akrosomenreaktion und ihre Relevanz bezüglich der Vorhersagbarkeit einer erfolgreichen In-vitro-Fertilisation. *Medizinische Dissertation, Universität Ulm (2005)*
3. Almeida-Val VM, Buck LT, Hochachka PW: Substrate and acute temperature effects on turtle heart and liver mitochondria. *Am J Physiol 266: 858-862 (1994)*
4. Altschuld RA, Wenger WC, Lamka KG, Kindig OR, Capen CC, Mizuhira V, Vander Heide RS, Brierley GP: Structural and functional properties of adult rat heart myocytes lysed with digitonin. *J Biol Chem 260: 14325-14334 (1985)*
5. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA: Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc) 70: 200-214 (2005)*
6. Antunes F, Boveris A, Cadenas E: On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA 101: 16774-16779 (2004)*
7. Aragonés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirkx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P: Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet 40: 170-180 (2008)*
8. Beavis AD, Lehninger AL: The upper and lower limits of the mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. Stoichiometry of oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem 158: 315-322 (1986)*
9. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemie. *5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 566-568 (2003)*
10. Bernard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R:

Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci 120: 838-848 (2007)*

11. Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Delage JP, Casteilla L, Letellier T, Rossignol R: Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol 291: C1172-1182 (2006)*
12. Birkedal R, Gesser H: Creatine kinase and mitochondrial respiration in hearts of trout, cod and freshwater turtle. *J Comp Physiol B 173: 493-499 (2003)*
13. Boelens R, Rademaker H, Wever R, Van Gelder BF: The cytochrome c oxidase-azide-nitric oxide complex as a model for the oxygen-binding site. *Biochim Biophys Acta 765: 196-209 (1984)*
14. Borutaite V, Budriunaite A, Morkuniene R, Brown GC: Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia. *Biochim Biophys Acta 1537: 101-109 (2001)*
15. Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsøe R, Dela F: Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia 50:790-796 (2007)*
16. Breen EP, Gouin SG, Murphy AF, Haines LR, Jackson AM, Pearson TW, Murphy PV, Porter RK: On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function. *J Biol Chem 281: 2114-2119 (2006)*
17. Chance B, Williams GR: Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. I. Kinetics of Oxygen Utilization. *J Biol Chem 217: 383–393 (1955 a)*
18. Chance B, Williams GR: Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem 217: 409-427 (1955 b)*
19. Chomyn A, Meola G, Bresolin N, Lai ST, Scarlato G, Attardi G: In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol 11: 2236-2244 (1991)*
20. D'Aurelio M, Pallotti F, Barrientos A, Gajewski CD, Kwong JQ, Bruno C, Beal MF, Manfredi G: In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome *c* oxidase subunit I. *J Biol Chem 276: 46925–46932 (2001)*
21. Diekert K, de Kroon AI, Ahting U, Niggemeyer B, Neupert W, de Kruijff B, Lill R: Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J 20: 5626-5635 (2001)*

22. Dulloo AG, Samec S: Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered. *Br J Nutr 86: 123-139 (2001)*

23. Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD: Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem 277: 47129-47135 (2002)*

24. Eghtesad B, Aucejo F, Fung JJ: Preservation solutions in liver transplantation: what are the options? *Liver Transpl 12:196-198 (2006)*

25. Erhard J, Lange R, Scherer R, Kox WJ, Bretschneider HJ, Gebhard MM, Eigler FW: Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study. *Transpl Int 7: 177-181 (1994)*

26. Estabrook RW: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol 10: 41-47 (1967)*

27. Fallert-Müller A, Hiller K, Lindequist U, Melzig MF: Lexikon der Biochemie in zwei Bänden, Band 1 A-I, *Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, S. 255 (1999)*

28. Fallert-Müller A, Hiller K, Lindequist U, Melzig MF: Lexikon der Biochemie in zwei Bänden, Band 2 J-Z, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 322-323 (2000)*

29. Fontaine EM, Keriel C, Lantuejoul S, Rigoulet M, Leverve XM, Saks VA : Cytoplasmic cellular structures control permeability of outer mitochondrial membrane for ADP and oxidative phosphorylation in rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun 213: 138-146 (1995)*

30. Gabai VL: Inhibition of uncoupled respiration in tumor cells. A possible role of mitochondrial Ca^{2+} efflux. *FEBS Lett 329: 67-71 (1993)*

31. Gan TJ, Bennett-Guerrero E, Phillips-Bute B, Wakeling H, Moskowitz DM, Olufolabi Y, Konstadt SN, Bradford C, Glass PS, Machin SJ, Mythen MG: Hextend, a physiologically balanced plasma expander for large volume use in major surgery: a randomized phase III clinical trial. Hextend Study Group. *Anesth Analg 88: 992-998 (1999)*

32. Garedew A, Hütter E, Haffner B, Gradl P, Gradl L, Jansen-Dürr P, Gnaiger E: High-resolution Respirometry for the Study of Mitochondrial Function in Health and Disease. The OROBOROS Oxygraph-2k. *In: Redl H (Hrsg) Proc. 11th*

Congress of the European Shock Society Vienna, Austria. Medimond, Bologna, S. 107-111 (2005)

33. Garedew A, Lemieux H, Schachner T, Blier PU, Tardif J-C, Gnaiger E: High excess capacity of cytochrome *c* oxidase in permeabilized fibers of the mouse heart. *Biochim Biophys Acta, EBEC Short Reports Supplement 14: 167-168 (2006)*
34. Glanville EJ, Seebacher F: Compensation for environmental change by complementary shifts of thermal sensitivity and thermoregulatory behaviour in an ectotherm. *J Exp Biol 209: 4869-4877 (2006)*
35. Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Méndez G, Eberl T, Margreiter R: Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr 27: 583-596 (1995)*
36. Gnaiger E, Lassnig B: DatLab Analysis: Oxygen Kinetics. *Mitochondrial Physiology Network 2.5: 1-18 (1997-2006)*
37. Gnaiger E, Kuznetsov AV, Lassnig B, Fuchs A, Reck M, Renner K, Stadlmann S, Rieger G, Margreiter R: High-resolution respirometry - optimum permeabilization of the cell membrane by digitonin. *In: Larsson C, Påhlman IL, Gustafsson L (Hrsg) BioThermoKinetics in the Post Genomic Era.Chalmers Reproservice, Göteborg, S. 89-95 (1998 a)*
38. Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov AV, Margreiter R: Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell. Effect of ADP on oxygen kinetics. *Biochim Biophys Acta 1365: 249-254 (1998 b)*
39. Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R: Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol 201: 1129-1139 (1998 c)*
40. Gnaiger E, Rieger G, Stadlmann S, Amberger A, Eberl T, Margreiter R: Mitochondrial defect in endothelial cold ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc 31: 994-995 (1999)*
41. Gnaiger E, Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, Brandacher G, Steurer W, Margreiter R: Mitochondria in the cold. *In: Heldmaier G, Klingenspor M (Hrsg) Life in the Cold. Springer, Heidelberg Berlin New York, S. 431-442 (2000 a)*
42. Gnaiger E, Méndez G, Hand SC: High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA 97:11080-11085 (2000 b)*

43. Gnaiger E: Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol 128: 277-297 (2001)*
44. Gnaiger E: The Oxygraph for High-Resolution Respirometry. *Mitochondrial Physiology Network 6.1: 1-19 (2001-2006)*
45. Gnaiger E: Test Experiments on Specifications of the OROBOROS Oxygraph. *Mitochondrial Physiology Network 6.5: 1-12 (2001-2007)*
46. Gnaiger E: Oxygen Calibration and Solubility in Experimental Media. *Mitochondrial Physiology Network 6.3: 1-8 (2001-2009)*
47. Gnaiger E, Kuznetsov AV: Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans 30: 252-258 (2002)*
48. Gnaiger E: Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology. *Adv Exp Med Biol 543: 39-55 (2003)*
49. Gnaiger E: DatLab 4 O_2 Flux Analysis: On-Line. *Mitochondrial Physiology Network 9.9: 1-15 (2004-2006 a.)*
50. Gnaiger E: DatLab 4 Oxygen Calibration. *Mitochondrial Physiology Network 9.8: 1-10 (2004-2006 b)*
51. Gnaiger E, Gradl P: Oxygraph-2k: Paradigm shift and features of high-resolution respirometry. *Mitochondrial Physiology Network 9.1: 1-8 (2004-2006)*
52. Gnaiger E: From oxygen concentration to oxygen flux. *Mitochondrial Physiology Network 10.5: 1-11 (2005-2006)*
53. Gnaiger E, Wright-Paradis C, Sondergaard H, Lundby C, Calbet JA, Saltin B, Helge J, Boushel R: High-resolution respirometry in small biopsies of human muscle: correlations with body mass index and age. *Mitochondrial Physiology Network 10.9: 14-15 (2005)*
54. Gnaiger E: Mitochondrial Pathways through Complexes I+II: Convergent Electron Transport at the Q-Junction and Additive Effect of Substrate Combinations. *In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. 2. Auflage, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, S. 21-37 (2008 a)*
55. Gnaiger E: Mitochondrial Pathways to Complex II, Glycerophosphate Dehydrogenase and Electron-Transferring Flavoprotein. *In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. 2. Auflage, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, S. 17-20 (2008 b)*
56. Gnaiger E: Mitochondrial Pathways to Complex I: Respiration with Pyruvate,

Glutamate and Malate. *In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. 2. Auflage, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, S. 7-15 (2008 c)*

57. Gnaiger E: MitoPathways: Respiratory States and Flux Control Ratios. *In: Gnaiger E (Hrsg)Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. 2. Auflage, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, S. 43-50 (2008 d)*
58. Gnaiger E: Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. *In: Dykens J, Will Y (Hrsg) Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction. John Wiley and Sons, Inc., S.327-352 (2008 e)*
59. Gnaiger E: Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol 41: 1837-1845 (2009)*
60. Groen AK, Wanders RJ, Westerhoff HV, van der Meer R, Tager JM: Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem 257: 2754-2757 (1982)*
61. Hafner RP, Brown GC, Brand MD: Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the 'top-down' approach of metabolic control theory. *Eur J Biochem 188: 313-319 (1990)*
62. Haller T, Ortner M, Gnaiger E: A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Anal Biochem 218: 338-342 (1994)*
63. Hardewig I, Peck LS, Pörtner HO: Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Notothenioid Lepidonotothen nudifrons. *J Comp Physiol B 169: 597-604 (1999)*
64. Hilton Z, Clements KD, Hickey AJ: Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J Comp Physiol B 180: 979-990 (2010)*
65. Hoppel C, Cooper C: The action of digitonin on rat liver mitochondria. The effects on enzyme content. *Biochem J 107: 367-375 (1968)*
66. Howland JL: The reversibility of antimycin inhibition. *Biochim Biophys Acta 153: 309-311 (1968)*
67. Hoyt RF Jr., Hawkins JV, St.Claire MB, Kennett MB: Mouse Physiology. *In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL (Hrsg) The*

Mouse in Biomedical Research. Volume Three. Normative Biology, Husbandry, and Models. 2. Auflage, Academic Press, Burlington San Diego London, S.31; 66-67 (2007)

68. Hütter E, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E: Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J 380: 919-928 (2004)*
69. Hütter E, Skovbro M, Lener B, Prats C, Rabøl R, Dela F, Jansen-Dürr P: Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell 6: 245-256 (2007)*
70. Irving DO, Watson K: Mitochondrial enzymes of tropical fish: a comparison with fish from cold-waters. *Comp Biochem Physiol B 54: 81- 92 (1976)*
71. Jain A, Mohanka R, Orloff M, Abt P, Kashyap R, Cullen J, Lansing K, Bozorgzadeh A: University of Wisconsin versus histidine-tryptophan-ketoglutarate for tissue preservation in live-donor liver transplantation. *Exp Clin Transplant 4: 451-457 (2006)*
72. Jüllig M, Hickey AJ, Chai CC, Skea GL, Middleditch MJ, Costa S, Choong SY, Philips AR, Cooper GJ: Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *Proteomics 8: 2556-2572 (2008)*
73. Kallerhoff M, Blech M, Kehrer G, Kleinert H, Siekmann W, Helmchen U, Bretschneider HJ: Post-ischemic renal function after kidney protection with the HTK-solution of Bretschneider. *Urol Res 14:271-277 (1986)*
74. Krohn E, Stinner B, Fleckenstein M, Gebhard MM, Bretschneider HJ: The cardioplegic solution HTK: effects on membrane potential, intracellular K^+ and Na^+ activities in sheep cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch 415: 269-275 (1989)*
75. Kunz WS, Kudin A, Vielhaber S, Elger CE, Attardi G, Villani G: Flux control of cytochrome *c* oxidase in human skeletal muscle. *J Biol Chem 275: 27741-27745 (2000)*
76. Kuznetsov AV, Clark JF, Winkler K, Kunz WS: Increase of flux control of cytochrome *c* oxidase in copper-deficient mottled brindled mice. *J Biol Chem 271: 283-288 (1996 a)*
77. Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Kay L, Daneshrad Z, Rossi A, Kadaja L, Peet N, Seppet E, Saks VA: Striking differences between the kinetics of

regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem 241: 909-915 (1996 b)*

78. Kuznetsov AV, Winkler K, Kirches E, Lins H, Feistner H, Kunz WS: Application of inhibitor titrations for the detection of oxidative phosphorylation defects in saponin-skinned muscle fibers of patients with mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta 1360: 142-150 (1997)*
79. Kuznetsov AV, Gnaiger E: Oxygraph Assay of Cytochrome *c* Oxidase Activity: Chemical Background Correction. *Mitochondrial Physiology Network* 6.6*: 1-4 (2001-2007)*
80. Kuznetsov AV, Strobl D, Ruttmann E, Königsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E: Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem 305: 186-194 (2002)*
81. Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, Brandacher G, Mark W, Steurer W, Saks V, Usson Y, Margreiter R, Gnaiger E: Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H1633-1641 (2004)*
82. Lee CP: Biochemical studies of isolated mitochondria from normal and diseased tissues. *Biochim Biophys Acta 1271: 21-28 (1995)*
83. Lemieux H, Garedew A, Blier PU, Tardif JC, Gnaiger E: Temperature effects on the control and capacity of mitochondrial respiration in permeabilized fibers of the mouse heart. *Biochim Biophys Acta, EBEC Short Reports Supplement 14:201-202 (2006)*
84. Letellier T, Heinrich R, Malgat M, Mazat JP: The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochem J 302: 171-174 (1994)*
85. Leterrier JF, Rusakov DA, Nelson BD, Linden M: Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro. *Microsc Res Tech 27: 233-261 (1994)*
86. Levy RJ, Vijayasarathy C, Raj NR, Avadhani NG, Deutschman CS: Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome c oxidase in sepsis. *Shock 21: 110-114 (2004)*
87. Levy RJ, Deutschman CS: Cytochrome c oxidase dysfunction in sepsis. *Crit Care Med 35: S468-475 (2007)*

88. Livingston BE, Altschuld RA, Hohl CM: Metabolic compartmentalization in neonatal swine myocytes. *Pediatr Res 40: 59-65 (1996)*

89. Löffler G, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. *7. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, S. 121-122 (2003)*

90. Lüllmann-Rauch R. Histologie. Verstehen-Lernen-Nachschlagen. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New-York, S. 53-54 (2003)*

91. Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA: Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transpl 12: 226-230 (2006)*

92. Méndez G, Gnaiger E: How does oxygen pressure control oxygen flux in isolated mitochondria? A methodological approach by high-resolution respirometry and digital data analysis. *In: Gnaiger E, Gellerich FN, Wyss M (Hrsg) What is Controlling Life? Modern Trends in BioThermo-Kinetics 3. Innsbruck Univ. Press, S. 191-194 (1994)*

93. Murphy MP: How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J 417: 1-13 (2009)*

94. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL: Lehninger principles of biochemistry. *4. Auflage, WH Freeman and Company New York, S. 690-722 (2005)*

95. Nicholls DG: The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem 50: 305-315 (1974)*

96. Park KS, Jo I, Pak K, Bae SW, Rhim H, Suh SH, Park J, Zhu H, So I, Kim KW: FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na^+ currents in bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Arch 443: 344-352 (2002)*

97. Phielix E, Schrauwen-Hinderling VB, Mensink M, Lenaers E, Meex R, Hoeks J, Kooi ME, Moonen-Kornips E, Sels JP, Hesselink MK, Schrauwen P: Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes 57: 2943-2949 (2008)*

98. Piel DA, Gruber PJ, Weinheimer CJ, Courtois MR, Robertson CM, Coopersmith CM, Deutschman CS, Levy RJ: Mitochondrial resuscitation with exogenous cytochrome c in the septic heart. *Crit Care Med 35: 2120-2127 (2007)*

99. Piel DA, Deutschman CS, Levy RJ: Exogenous cytochrome C restores myocardial

cytochrome oxidase activity into the late phase of sepsis. *Shock 29: 612-616 (2008)*

100. Pietrobon D, Azzone GF, Walz D: Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-driven H^+-pumps in mitochondria: on the nature of 'leaks'. *Eur J Biochem 117: 389-394 (1981)*
101. Proger S, Dekaneas D, Schmidt G: Some observations on the effect of injected cytochrome C in animals. *J Clin Invest 24: 864-868 (1945)*
102. Rabøl R, Højberg PM, Almdal T, Boushel R, Haugaard SB, Madsbad S, Dela F: Effect of hyperglycemia on mitochondrial respiration in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab 94:1372-1378 (2009)*
103. Racine L, Scoazec JY, Moreau A, Bernuau D, Feldmann G: Effects of digitonin on the intracellular content of rat hepatocytes: implications for its use in the study of intralobular heterogeneity. *J Histochem Cytochem 41: 991-1001 (1993)*
104. Rasmussen HN: Techniques for biochemical respiration measurements. *Anal Biochem 95: 416-428 (1979)*
105. Rasmussen HN, Rasmussen UF: Small scale preparation of skeletal muscle mitochondria, criteria of integrity, and assays with reference to tissue function. *Mol Cell Biochem 174: 55-60 (1997)*
106. Rasmussen UF, Rasmussen HN: The NADH oxidase system (external) of muscle mitochondria and its role in the oxidation of cytoplasmic NADH. *Biochem J 229: 631-641 (1985)*
107. Rasmussen UF, Rasmussen HN, Andersen AJ, Fogd Jørgensen P, Quistorff B: Characterization of mitochondria from pig muscle: higher activity of exo-NADH oxidase in animals suffering from malignant hyperthermia. *Biochem J 315: 659-663 (1996)*
108. Rasmussen UF, Rasmussen HN: Human quadriceps muscle mitochondria: a functional characterization. *Mol Cell Biochem 208: 37-44 (2000)*
109. Rasmussen UF, Krustrup P, Bangsbo J, Rasmussen HN: The effect of high-intensity exhaustive exercise studied in isolated mitochondria from human skeletal muscle. *Pflügers Arch 443:180-187 (2001 a)*
110. Rasmussen UF, Rasmussen HN, Krustrup P, Quistorff B, Saltin B, Bangsbo J. Aerobic metabolism of human quadriceps muscle: in vivo data parallel measurements on isolated mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E301-307 (2001 b)*

111. Remick DG, Xioa H: Hypothermia and sepsis. *Front Biosci 11: 1006-1013 (2006)*

112. Renner K, Haffner B, Gnaiger E: Mitochondrial Respiration Medium - MiR05. *Mitochondrial Physiology Network 8.5:1-4 (2003-2008)*

113. Ringe B, Braun F, Moritz M, Zeldin G, Soriano H, Meyers W: Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution. *Transplant Proc 37: 316-319 (2005)*

114. Roberts RB, Threadgill DW: The Mouse in Biomedical Research. *In: Eisen EJ (Hrsg) The Mouse in Animal Genetics and Breeding Research. Imperial College Press, London, S. 319 (2005)*

115. Rolfe DF, Newman JM, Buckingham JA, Clark MG, Brand MD: Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol 276: C692-699 (1999)*

116. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T: Mitochondrial threshold effects. *Biochem J 370: 751-762 (2003)*

117. Saks VA, Belikova YO, Kuznetsov AV: In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta 1074: 302-311 (1991)*

118. Saks VA, Vasil'eva E, Belikova YO, Kuznetsov AV, Lyapina S, Petrova L, Perov NA: Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta 1144: 134-148 (1993)*

119. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova OY, Kuznetsov AV: Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration - a synthesis. *Mol Cell Biochem 133-134:155-192 (1994)*

120. Saks VA, Kuznetsov AV, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova YO, Kesvatera T, Tiivel T: Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J Mol Cell Cardiol 27: 625-645 (1995)*

121. Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F, Kunz WS: Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem 184: 81-100 (1998)*

122. Sarti P, Silver RB, Paroli L, Nikonorov I, Blanck TJ: Permeability of rat heart

myocytes to cytochrome c. *Cell Mol Life Sci 56: 1061-1069 (1999)*

123. Severinghaus JW: The invention and development of blood gas analysis apparatus. *Anesthesiology 97: 253-256 (2002)*

124. Shabalina IG, Kramarova TV, Nedergaard J, Cannon B: Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively. *Biochem J 399: 405-414 (2006)*

125. Steinlechner-Maran R, Eberl T, Kunc M, Margreiter R, Gnaiger E: Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. *Am J Physiol 271: C2053-C2061 (1996)*

126. St. Pierre J, Tattersall GJ, Boutilier RG: Metabolic depression and enhanced O_2 affinity of mitochondria in hypoxic hypometabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279: R1205-R1214 (2000)*

127. Su F, Nguyen ND, Wang Z, Cai Y, Rogiers P, Vincent JL : Fever control in septic shock: beneficial or harmful? *Shock 23: 516-520 (2005)*

128. Terpstra AH: Differences between humans and mice in efficacy of the body fat lowering effect of conjugated linoleic acid: role of metabolic rate. *J Nutr 131: 2067-2068 (2001)*

129. Tonkonogi M, Walsh B, Tiivel T, Saks V, Sahlin K: Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. *Pflügers Arch 437: 562-568 (1999)*

130. Vestweber D, Schatz G: Mitochondria can import artificial precursor proteins containing a branched polypeptide chain or a carboxy-terminal stilbene disulfonate. *J Cell Biol 107:2045-2049 (1988)*

131. Villani G, Attardi G: In vivo control of respiration by cytochrome *c* oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci USA 94: 1166-1171 (1997)*

132. Villani G, Greco M, Papa S, Attardi G: Low reserve of Cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types. *J Biol Chem 273: 31829-31836 (1998)*

133. Von Ahsen O, Waterhouse NJ, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR: The 'harmless' release of cytochrome c. *Cell Death Differ 7: 1192-1199 (2000)*

134. Wang X, Dumont ME, Sherman F: Sequence requirements for mitochondrial import of yeast cytochrome c. *J Biol Chem 271: 6594-6604 (1996)*

135. Weinstein RB, Somero GN: Effects of temperature on mitochondrial function in the Antarctic fish Trematomus bernacchii. *J Comp Physiol B 168: 190-196 (1998)*

136. Wijers SL, Schrauwen P, Saris WH, van Marken Lichtenbelt WD: Human skeletal muscle mitochondrial uncoupling is associated with cold induced adaptive thermogenesis. *PLoS One 3: e1777 (2008)*

137. Zangl Q: Funktion hepatischer Mitochondrien nach Ischämie-Reperfusion und vorheriger Behandlung mit Schwefelwasserstoff im Großtierversuch. *Medizinische Dissertation, Universität Ulm (2011)*

7 Lebenslauf

7.1. Persönliche Daten:

Name: Majer, Susanne Linda

Gebrtsdatum/-ort: 1984/Ulm an der Donau

7.2. Schulbildung:

1991-1995: Grundschule (Volksschule Neu-Ulm/Offenhausen)

1995-2004: Gymnasium (Lessing-Gymnasium Neu-Ulm)

2004: Abitur

7.3. Studium:

7.3.1. Vorklinischer Abschnitt:

10/2004: Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Ulm

08-10/2006: Erste ärztliche Prüfung

7.3.2. Klinischer Abschnitt:

Famulaturen:

26.03.-15.04.2007: Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Ulm

24.09.-14.10.2007: Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Ulm

05.03.-06.04.2008: Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Ulm

23.07.-22.08.2008: Bethesda Geriatrische Klinik Ulm. Akademisches Krankenhaus der Universität Ulm

26.01.-08.02.2009: Klinik für diagnostische und interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Ulm

Praktisches Jahr:

Klinik am Eichert, akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Ulm, Göppingen:

31.08.-20.12.2009: 1. Tertial: Innere Medizin

21.12.2009-11.04.2010: 2. Tertial: Radiologie

12.04.-01.08.2010: 3. Tertial: Chirurgie

Abschluss:
Herbst/Winter 2010

7.4. Berufsleben

Januar 2011: Aufnahme der Tätigkeit als Assistenzärztin im Klinikum Sindelfingen-Böblingen in der Abteilung für Innere Medizin.

8 Danksagung

Dieser Teil der Dissertation ist all denjenigen gewidmet, die mir bei den Versuchen und der Erstellung dieser Arbeit helfend zur Seite gestanden haben. Zu allererst ist hier Herr Prof. Dr. Enrico Calzia zu nennen, der sich sehr viel Zeit für die Einarbeitung in die praktischen Versuche genommen hat und bei Fragen immer erreichbar war. Ich möchte ihm für seine geduldige Betreuung und seine konstruktive Kritik danken.

Ebenfalls gilt mein Dank den Mitarbeitern der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, vor allem Frau Sandra Weber, Frau Ingrid Eble, Frau Andrea Söll und Frau Tanja Schulz, die mir bei Problemen zu jeder Tages- und Nachtzeit helfend unter die Arme griffen.

Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern Gisela und Werner und meinen Geschwistern Bernhard und Petra, die mich in allen Phasen meines Lebens immer tatkräftig und emotional unterstützen, vor allen Dingen in denjenigen Momenten, in denen nicht alles so läuft, wie geplant.