

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
an der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg**  
Komm. Direktorin: PD Dr. med. Gabriele Hänsgen



**Respiratorische Mitochondrienfunktion in implantierten  
R1H-Rhabdomyosarkomen im Vergleich zu normalen  
Skelettmuskeln der Ratte**

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

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tanja Pelz

geboren am 22.04.1975 in Halle/ Saale

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. habil. J. Dunst
2. PD Dr. med. G. Hänsgen

Datum der Eröffnung: 18.12.2007

Datum der Verteidigung: 25.02.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013614**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013614>]

## Referat und bibliographische Beschreibung

**Einleitung:** Veränderungen der respiratorischen Mitochondrienfunktion prägen den Energiemetabolismus in Tumoren. Respiratorische Untersuchungen mitochondrialer Parameter an normalen und pathologisch veränderten Geweben werden schon seit einiger Zeit durchgeführt. Um spezifische Veränderungen der mitochondrialen Atmung in Tumorgewebe detektieren zu können, müssen immer Vergleiche mit den gesunden Ausgangsgewebe erfolgen.

**Material und Methoden:** Es wurden neurologisch etablierte Untersuchungsmethoden an Tumorzellen und -geweben durchgeführt, wie die hochauflösende Respirimetrie und die Enzymdiagnostik. Untersucht wurden 11 Skelettmuskeln von Ratten, die als Normalgewebe mit pathologisch verändertem Tumorgewebe verglichen wurden. Als pathologisch verändertes Gewebe diente ein implantierter Experimentaltumor das R1H-Rhabdomyosarkom. Die Permeabilisation der Zellmembranen erfolgte bei beiden Gewebearten mittels der skinned fiber- Technik. Die respiratorischen Messungen wurden mittels der multiplen Substrat- Inhibitor- Technik durchgeführt. Die OXPHOS- Kapazitäten wurden respiratorisch sowie photospektrometrisch- enzymatisch bestimmt und zusätzlich wurden die zytosolischen glykolytischen Markerenzyme gemessen.

**Ergebnisse:** Zunächst wurden an 11 Ratten respiratorisch die Atmungsraten der R1H-Rhabdomyosarkome am Oxygraphen bestimmt. Die Atmungsaktivität am Komplex I war im R1H-Tumor gegenüber dem Skelettmuskel deutlich verringert ( $0,56 \pm 0,28$  nmolO<sub>2</sub>/mg/min vs.  $2,32 \pm 1,19$  nmolO<sub>2</sub>/mg/min,  $p < 0,0001$ ). Ebenfalls verringert waren die Atmungsaktivität am Komplex II ( $1,00 \pm 0,29$  nmolO<sub>2</sub>/mg/min vs.  $1,55 \pm 0,63$  nmolO<sub>2</sub>/mg/min,  $p < 0,001$ ) sowie die SRPR ist im Tumor ( $56 \pm 25\%$  vs.  $145 \pm 56\%$ ,  $p < 0,001$ ). Dies wurde durch eine erhöhte Rotenon- insensitive NADH- Oxidation in Bezug zur Gesamtaktivität des Komplex I gestützt (R1H-Rhabdomyosarkom  $15 \pm 8\%$  vs. Rattenmuskel  $80 \pm 7\%$ ,  $p < 0,001$ ).

Diese Ergebnisse wurden mit der Photospektrometrie überprüft. Es zeigte sich eine besondere Aktivitätsabnahme der CS im R1H gegenüber dem Muskel ( $7,1 \pm 2,4$  U/g vs.  $15 \pm 2,8$  U/g Trockengewicht,  $p < 0,001$ ). Des Weiteren wurde ein Anstieg des Verhältnisses COX/ CS in den R1H- Tumoren gesehen ( $71 \pm 30$  vs.  $60 \pm 17$ , n. s.). Das Verhältnis der Enzymaktivitäten der Komplexe II+III/CS nahm leicht im R1H zu ( $31 \pm 19$  vs.  $23 \pm 7$ , n. s.). Dagegen kam es zur Abnahme der Enzymaktivitäten der R1H, wenn man die Verhältnisse der Komplexe I+III/CS ( $3 \pm 4$  vs.  $4 \pm 2$ , n. s.) und I/CS ( $6 \pm 3$  gegen  $12 \pm 4$ ,  $p < 0,018$ ) bildet. Bestimmt man die SRNO, so ergab sich eine messbare Abnahme im R1H-Tumor ( $13 \pm 11\%$  vs.  $22 \pm 13\%$ , n.s.). Weiterhin wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Atmungsraten von 9 Proben aus dem Tumorrand und 9 Proben aus dem Tumorzentrum aus 2 Tumoren verglichen. Die mittlere Atmungsaktivität im Komplex I war im Randbereich gegenüber dem Tumorzentrum leicht verringert ( $16,8 \pm 6,7$  J-O<sub>2</sub>/mg/min vs.  $20,2 \pm 3,1$  J-O<sub>2</sub>/mg/min). Ebenfalls verringert war die Atmungsaktivität im Komplex II im Randbereich ( $19,2 \pm 5,2$  J-O<sub>2</sub>/mg/min vs.  $20,7 \pm 2,9$  J-O<sub>2</sub>/mg/min) und die SRPR ( $88,2 \pm 15\%$  gegen  $97 \pm 11\%$  gegen  $93 \pm 9\%$ ). Die Ergebnisse zeigten somit eine diskret verringerte Atmungsrate der Komplexe I und II im Randbereich gegenüber dem nekrotischen Tumorzentrum.

**Schlussfolgerungen:** Die angewandten Techniken ermöglichen es, reproduzierbar und verifizierbar die Funktionen der OXPHOS in Tumoren und auch in gesunden Geweben zu prüfen. Zudem konnten spezifische respiratorische Defekte in den Tumormitochondrien bewiesen werden.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Entstehung der Mitochondrien .....	1
1.2	Aufbau und Funktion der Mitochondrien .....	1
1.3	Bedeutung der Mitochondrien in Tumoren .....	5
1.4	Ziele der Untersuchung .....	7
2	Material und Methoden .....	7
2.1	Experimentaltumormodell R1H- Rhabdomyosarkom .....	7
2.2	Methoden .....	10
2.2.1	Skinned fiber- Technik .....	10
2.2.2	Hochauflösende Respirometrie .....	11
2.2.3	Herstellung von Gewebehomogenaten .....	15
2.2.4	Photospektrometrische Messungen .....	16
2.2.5	Proteinanalyse .....	23
2.2.6	Statistik .....	23
3	Ergebnisse .....	23
3.1	Respirometrie und Photospektrometrie der Normalgewebe der Ratte .....	23
3.2	Respirometrie der R1H- Rhabdomyosarkome .....	27
3.3	Photospektrometrie der R1H- Rhabdomyosarkome .....	31
3.4.	Einfluss von Alter und Tumormikromilieu auf die Zellatmung .....	32
4	Diskussion .....	34
4.1	Mitochondriale Medizin .....	34
4.2	Übertragung respirometrischer Messmethoden auf R1H- Rhabdomyosarkome .....	38
4.3	Spezifische Atmungskomplex-Störungen in R1H-Rhabdomyosarkomen .....	42
4.4	Rotenonhemmung in R1H- Rhabdomyosarkomen .....	43
4.5	Einfluss des Tumormikromilieus auf die respiratorische Kapazität .....	45
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung .....	47
6	Literatur .....	48
7	Thesen .....	63

8	Erklärungen
9	Lebenslauf
10	Danksagung
11	Publikationen

## Abkürzungsverzeichnis

Gemäß der internationalen Konvention sind Gene *kursiv* und Proteine sowie Substrate nicht kursiv gesetzt.

Abkürzung	Name
ADP	Adenosindiphosphat
<i>Ant-1</i>	Gen
Anti A	Antimycin A
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Komplex V der Atmungskette
Bcl	B- Cell Leukämie- Protein
CAT	Atractylatatmung
CoQ	Coenzym Q, Synonym: Ubichinon
COX	Cytochrom c- Oxidase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CS	Citratsynthase
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CPT	Carnitin- Palmityltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithio- 2-Nitrobenzolsäure
EDTA	Äthylendiaminessigsäure
FAD	Flavin- adenin- dinukleotid
G6P	Glukose- 6- Phosphat
HCL	Salzsäure
HEPS	Hochenergetische Pufferlösung
HK	Hexokinase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
K	Komplex der Atmungskette
KSS	Kearn- Sayre- Syndrom
LDH	Laktatdehydrogenase
MELAS	Metabolische Enzephalopathie, Laktatazidose, Schlaganfallneigung
<i>mevl-</i>	Gen

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitochondriale DNA
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid- adenin- dinukleotid
NADPH	Nikotinamid- adenin- dinukleotid- phosphat
NCP	Nicht- kollageniertes Protein
nDNA	Nukleäre Desoxyribonukleinsäure
<i>ND</i>	mtDNA- Gen
<i>NDUFV1-4</i>	nDNA- Gene
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
P	Phosphat
p	Protein
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEO	Progressive externe Ophthalmoplegie
PGI	Phosphoglukoisomerase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck im Gewebe
PT	Permeability transition Pore
Pyr	Pyruvat
RCI	Flux- Kontrollindex
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Oxygen Spezies
Rot	Rotenon
SDH	Succinatdehydrogenase
SPSS	Statistikprogramm Microsoft
SRNO	Succinat- bezogene NADH- Oxidation
SRPR	Succinat- bezogene Pyruvatatmung
Suc	Succinat
<i>SURF1</i>	Gen der COX
S <sub>2</sub> H	Substrat- Wasserstoff
tRNA	Transfer- Ribonukleinsäure
UCP	Entkopplerprotein

# **1 Einleitung**

Tumorzellen haben eine Neigung zur Glykolyse unter aeroben Bedingungen. Dies ist seit langem Anlass, die Beteiligung der Mitochondrien an der Tumorgenese zu untersuchen. Otto Warburg gelang es erstmals nachzuweisen, dass Veränderungen an den Mitochondrien in der Pathogenese von Tumoren auftreten (Warburg 1956). Seit dieser Zeit konnten zahlreiche Untersuchungen eine Reihe von spezifischen Unterschieden in den Stoffwechselwegen der Tumorzellen im Vergleich zu ihren Ursprungszellen zeigen.

## **1.1 Entstehung der Mitochondrien**

In der Evolution hat die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) durch die in den Mitochondrien stattfindende Zellatmung erst seit der Zunahme des atmosphärischen Sauerstoffgehaltes essentiellen Charakter. Unter den zuvor herrschenden anaeroben Bedingungen wurde die Energiebereitstellung und -konservierung allein über die Glykolyse realisiert. Die symbiotische Verschmelzung von kernhaltigen anaeroben Zellen mit kernlosen Zellen, die unter aeroben Bedingungen leben können, führte erstmalig zur Zellatmung unter aeroben Bedingungen in kernhaltigen Zellen und auch zum Vorhandensein von zwei DNA-Anteilen unterschiedlicher Herkunft in einer Zelle, die mittels multipler Stoffwechselwege zu einer Kommunikation und Interaktion gezwungen waren. Über die Zeit wurden immer mehr DNA-Abschnitte aus den Mitochondrien in den Zellkern verlagert, so dass der DNA-Gehalt der Mitochondrien (mt-DNA) heute verschwindend gering ist.

## **1.2 Aufbau und Funktion der Mitochondrien**

Die Mitochondrien sind als „Kraftwerke“ Bestandteil sämtlicher eukaryontischer Zellen mit Ausnahme reifer Erythrozyten. Der Begriff des „Mitochondrion“ wurde erstmals 1898 von Carl Benda (1857 bis 1932) als Terminus eingeführt, wobei sich das Wort aus der griechischen Sprache: mitos= Schleife und chondrion= Körnchen ableitet (Benda 1898). In Abhängigkeit von der Zellart nehmen Mitochondrien 3%

bis 25% des Zellvolumens ein und sind in der Lage, selbständig durch das Zytoplasma der Zelle zu wandern. Mitochondrien können in ihrer Größe (mittlerer Durchmesser 0,5-1µm und mittlere Länge etwa 1 bis 5µm, somit lichtmikroskopisch erkennbar) und Form (kugel-, stab- oder fadenförmig, manchmal verzweigt) variieren, besitzen jedoch alle die gleiche grundlegende Struktur, Abbildung 1. Sie werden nach außen begrenzt von einer glatten, wie ein Phospholipid- Bilayer aufgebauten, ca. 7 nm dicken Doppelmembran. Für Produkte des Stoffwechsels ist die Außenmembran frei permeabel (passiv). Sie enthält jedoch auch Proteine, wie z.B. Porine, die als Kanäle durch die Membran ziehen und so die Dichtigkeit der Membran stärken oder lockern können (aktiver Transport). Demgegenüber ist die innere Membran, die statt Cholesterin (ähnlich wie in Bakterienzellen) Cardiolipin enthält, für Ionen und andere kleine Moleküle undurchlässig, sofern nicht spezialisierte Transportproteine die Permeabilität ermöglichen (Bernardi 1999). Aus der Innenmembran ragen schlauchförmige (Tubuli), blattförmige (Christae) oder sackförmige (Sacculi) Einstülpungen in den Innenraum (Matrix) des Organells und vergrößern so erheblich die Membranoberfläche. Die metabolische Aktivität einer Zelle hängt von der Anzahl der Mitochondrien und der Ausprägung dieser Christae ab. So haben Zellen mit großer metabolischer Aktivität, wie z.B. Herzmuskelzellen, viele und gut entwickelte Mitochondrien. Durch die Christae wird eine doppelte Kompartimentierung im Inneren der Mitochondrien geschaffen, die zwischen der Außen- und Innenmembran das nichtplasmatische Kompartiment (Intermembranraum) und innerhalb der inneren Membran das plasmatische Kompartiment (Matrixraum) bildet, Abbildung 1.

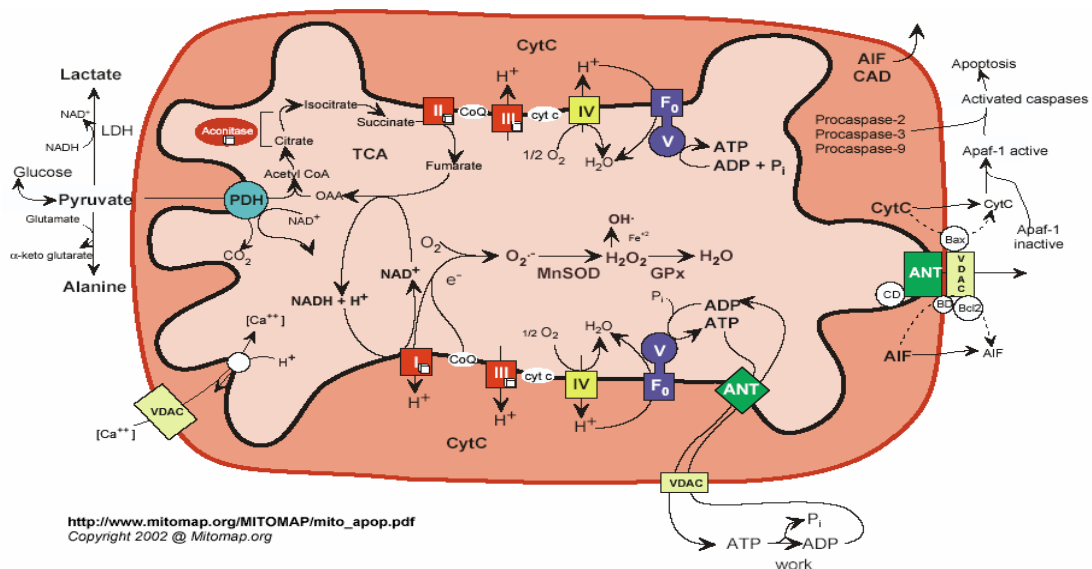
Die Matrix enthält neben Proteinen, Ribosomen und Lipiden eine variable Anzahl von mtDNA- Molekülen mit ungefähr zwei bis zehn Kopien. Wie schon vorher beschrieben, wird weithin angenommen, dass die Mitochondrien ursprünglich Bakterien waren, die nach Erhöhung des Sauerstoffes in der Atmosphäre, mit den sich entwickelnden Eukaryontenzellen eine Symbiose ihrer Stoffwechsel eingegangen sind. Es kam zum Austausch der beiden eigenständigen DNA's (nDNA und mtDNA), wobei der überwiegende DNA- Gehalt von den Mitochondrien an den Nukleus abgegeben wurde. Daraus ergibt sich eine enge funktionelle Synthese von mt- und nDNA. Die mtDNA wird fast ausschließlich (99%) maternal vererbt. Die mtDNA ist doppelsträngig, sehr kompakt, ohne Exons und mit nur wenig Introns ausgestattet.



Eine komplette Sequenzierung der mtDNA gelang erstmals Anderson et al. (1981). Die humane mtDNA besteht aus 16 569 Basenpaaren. Die Mitochondrien setzen sich aus mehr als 800 unterschiedlichen Proteinen zusammen, von denen lediglich 13 Proteine im Mitochondrium selbst synthetisiert werden. Diese 13 Proteine sind alle Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette (OXPHOS). Für ihre Herstellung sind zusätzlich 220 vom Zellkern kodierte Proteine erforderlich. Ungefähr 150 mitochondriale Proteine haben noch eine unbekannte Funktion (Sickmann et al. 2003). Des Weiteren werden von der mtDNA zwei mitochondriale RNA-Arten kodiert (2 rRNAs, 22 tRNAs). Nur ein Teil der Proteinsynthese der Mitochondrien läuft über spezielle mitochondriale Ribosomen. Die überwiegende Anzahl mitochondrialer Proteine wird an zytoplasmatischen Ribosomen, die sich strukturell von den mitochondrialen Ribosomen unterscheiden, mit Hilfe eines Signalpeptides gebildet und dann über spezielle Kanäle, die TIM und TOM- Komplexe, in die Mitochondrien geschleust (Pfanner & Meijer 1997).

Die Innenmembran enthält fünf Komplexe, die so genannten integralen Membranproteine. Vier von ihnen bilden die Atmungskette (OXPHOS): Komplex I, II und III beliefern die Cytochrom c- Oxidase (COX) mit Elektronen für die Reduktion des Sauerstoffs. Die Komplexe I, III und COX verwenden die Redox-Energie für das Pumpen von Protonen ( $H^+$ ) vom Matrixraum in den Intermembranraum entgegen des elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\psi$ ), mit der Folge des Absinkes des pH in diesem Intermembranraum. Die angehäuften  $H^+$  fließen dann entlang des  $\Delta\psi$  - Gradienten durch den Komplex V (ATPase,  $F_0F_1$ - Synthase) wieder in die Mitochondrienmatrix zurück. ADP wird zu ATP phosphoryliert. Zusätzlich wird dieser Gradient für energieabhängige Substrattransporte über zahlreiche Translokatoren in den Mitochondrien gebraucht. Leckstellen (leaks) der Innenmembran, z.B. durch aktivierte Entkopplerproteine (UCP) oder geöffnete Permeabilitäts- Poren (permeability transitions), die die Protonen zurück in die mitochondriale Matrix fließen lassen, verringern die Ausbeute an ATP (Bernardi 1999, Ricquier & Bouillaud 2000). Dieser Protonenrückfluss vermindert zwar das  $\Delta\psi$ , aber reaktiviert auch wieder die Atmungskette. Zusammen mit dem aktiven, ununterbrochenen Herauspumpen von Protonen durch die Atmungskettenkomplexe I, III und COX wirkt der Rückfluss der Protonen als ein ineffizienter Kreislauf, der Wärme produziert.

Die originäre Aufgabe der Mitochondrien besteht in der ATP- Produktion zur Energiebereitstellung für die verschiedenen Stoffwechsellösungen. Mit der Oxidation von Substraten des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) erzeugen die Mitochondrien die Hauptmenge des energieliefernden ATP, das für die normale Zellarbeit lebensnotwendig ist. Des Weiteren werden Aminosäuren, Fettsäuren, Steroide und Harnstoff in den Mitochondrien metabolisiert. Seit einiger Zeit sind weitere spezifische Aufgaben der Mitochondrien bekannt geworden. So nehmen Mitochondrien spezielle Funktion in der  $Ca^{2+}$  - Regulation sowie in der Biosynthese der Orotsäure ein (Eichler & Schertel 1988, Jockel et al. 1998, Löffler et al. 1997). Einige wichtige anabole Enzyme sind in den Mitochondrien lokalisiert, wie z.B. die Dihydrorotat- Dehydrogenase, die an der äußeren Seite der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert und für die Nukleotidsynthese notwendig ist (Löffler et al. 1997). Zudem besitzen Mitochondrien eine Schlüsselrolle als Sensor und Auslöser in den Pathways der Apoptose und Nekrose (Green & Reed 1998). Dies dokumentiert die Komplexität der Interaktionen zwischen den Mitochondrien und den anderen Zellbestandteilen.



**Abbildung 1.** Darstellung eines Mitochondriums einer Säugerzelle. Zusammenhang zwischen der Energieproduktion, der ROS- Erzeugung und der Apoptose (MITOMAP 2005). Im dunkleren Rot wird das zwischen der Außen- und Innenmembran befindliche so genannte nichtplasmatische Kompartiment und im helleren Rosa, das innerhalb der Innenmembran befindliche plasmatische Kompartiment, die Matrix, dargestellt.

### 1.3 Bedeutung der Mitochondrien in Tumoren

Tumorzellen weisen im Vergleich zu Normalzellen einen veränderten Stoffwechsel auf. Otto Warburg (1966) beschrieb, dass „die letzte Ursache des Krebses ... der Ersatz der Sauerstoffatmung der Körperzellen durch die Gärung“ sei. Dabei fand er heraus, dass „zum Krebsstoffwechsel nicht nur die zu große Gärung, sondern auch eine zu kleine Atmung“ gehöre (Warburg 1965). Die Fermente der Atmung würden von ihren Substraten „entkoppelt“ und bedingen so die Karzinogenese. Bei ausreichendem Glukose- und Sauerstoffangebot stellen Tumoren zu 95% auf Glykolyse um, aus der dann der überwiegende Teil des benötigten ATP generiert wird (Reitzer et al. 1979). Der in der Energiegleichung wesentlich effizientere Weg der ATP- Gewinnung über die OXPHOS der Atmungskette wird somit in Tumorzellen nur zu ungefähr 5% beschränkt (Rossingol et al. 2004). Daher sind Tumoren von der Anwesenheit von Sauerstoff weitestgehend unabhängig. Dies ist ein gravierender Unterschied zu Normalzellen, bei denen eine Ischämie oder länger dauernde Hypoxie regelhaft in den Zustand der energetischen Depression mündet und zur Einleitung von Apoptose oder Nekrose führt (Gellerich et al. 2003).

Verglichen mit Normalzellen ist von den Mitochondrien in Tumorzellen bekannt, dass sie sich in ihrem Aussehen, ihrer Größe und Dichte unterscheiden. Beobachtet wurde vor allem eine Abnahme ihrer Zahl (Cuezva et al. 2002). Doch auch Zunahmen wurden registriert, was als Anpassungszustand an den veränderten Energiestoffwechsel bei maligner Progression gedeutet wurde (Kim et al. 2004). Dies ist möglicherweise auch eine Folge der Verschiebung der Relation von aerober Atmung zur aeroben Glykolyse in den Tumoren. In der überwiegenden Mehrzahl zeichnen sich Tumoren als ein Ort mit stark erhöhter Glukosespeicherung und erhöhtem Glukoseumsatz aus, wodurch eine Hemmung der endogenen Atmung eintritt. Erstmals wurde dieses Phänomen von Herbert G. Crabtree (1929) beschrieben und nach ihm „Crabtree effect“ benannt. Anderen Autoren gelang es, dieses Phänomen auch in Normalzellen nachzuweisen, wobei all diesen Zellen gemeinsam die hohe Proliferationsrate und die erhöhte Glykolyserate ist (Guppy et al. 1993, Leese & Bronk 1975, Seshagiri & Bavister 1991). Viele Mechanismen wurden zwischenzeitlich beschrieben, warum dieser Effekt in Tumorzellen und in Zellen mit vermehrter Glykolyse auftritt, so wurden der Wettbewerb zwischen Glykolyse und Atmung um ADP oder anorganisches Phosphat, Veränderungen des intrazellulären

pH, Änderungen in der Dichtigkeit der mitochondrialen Membranen, vermehrte Expression der Glykolyseenzyme, spezifische Lageveränderungen von Enzymen (z.B. HK II- Bindungen) und Kalziumaufnahme als ursächlich angesehen (Bustamante et al. 1981, Chance & Hess 1959, Evtodienko et al. 1994, Ibsen et al. 1960, Koobs 1972, Mathupala et al. 1997a,b, Packer & Golder 1960, Pedersen et al. 2002, Teplova et al. 1993).

Die Daten der Literatur zeigen unterschiedliche Forschungsergebnisse hinsichtlich einer spezifischen Störung der Atmungskettenkomplexe in Tumoren. Wie bei einigen mitochondrialen Erkrankungen, so konnte auch bei einigen Experimenten an Tumorzellen eine Komplex I- Hemmung nachgewiesen werden, die für den veränderten Tumorstoffwechsel verantwortlich war (Lichtor & Dohrmann 1986). Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen lassen vermuten, dass im Modelltumor der Ratte, dem R1H- Rhabdomyosarkom, die Mitochondrienfunktionen ebenso in ihrer OXPHOS verändert und möglicherweise Ursache für die signifikante Neigung zur aeroben Glykolyse waren.

Maligne Tumoren sind in ihrer Morphologie sehr heterogen aufgebaut. Nur zu etwa 50% besteht ein maligner solider Tumor auch aus klonogenen Tumorzellen. Der andere Teil setzt sich aus verschiedenen Stromazellen, wie Blutgefäße, Lymphgefäße und Bindegewebszellen zusammen. Bei Tumoren mit besonders schnellem Wachstum, werden zudem Zonen mit weitgehend abgestorbenen Tumorzellen gefunden. Mikroskopisch grenzen sie sich als Nekrosezonen vom weiteren Tumorgewebe ab. Da bei einem chaotisch anmutenden Gefäßnetz die Diffusionsstrecken für Sauerstoff und Glukose sehr unterschiedlich sein können, existieren sehr heterogene Tumormuster. Vom R1H- Rhabdomyosarkom ist bekannt, dass es im Randbereich eine besonders gut vaskularisierte Zone mit vielen vitalen Tumorzellen besitzt, während dessen im Tumorzentrum die Nekrosezone entsteht, wenn der Tumordurchmesser  $>2\text{cm}^3$  beträgt.

## **1.4 Ziele der Untersuchung**

Ziel unserer Untersuchung war es die in der Neurologie für Muskelfasern erprobte Methoden, wie die skinned fiber-Technik (enthäutete Faser- Technik) und die oxygraphische Messung der Atmungskettenkomplexe mittels hochauflösender Respirometrie und multipler Substrat- Inhibitor- Technik, auf Tumorgewebe der Ratte anzuwenden. Daher standen zunächst grundlegende Untersuchungen von Normalzellen und Tumorzellen zur generellen Machbarkeit im Vordergrund.

1. Überprüfung der Methode der skinned fiber- Technik und der multiplen Substrat- Inhibitor- Technik zur respirometrischen Untersuchung am Oxygraphen und photometrische Kontrolle am Spektrometer für Tumorgewebeproben im Vergleich zu Normalgeweben, wie z.B. Skelettmuskel, Niere und Leber der Ratte.

Nachdem die Methoden sicher erlernt und repräsentative Ergebnisse für Normal- und Tumorgewebeproben der Ratte erbracht wurden, sollte zusätzlich die Frage geklärt werden, ob innerhalb des implantierten Experimentaltumors, aufgrund unterschiedlicher Mikromilieubedingungen, differierende respiratorische Kapazitäten vorliegen.

2. Untersuchungen im gut perfundierten Randbereich und in der zentralen Nekroseregion der implantierten R1H-Tumoren der Ratte.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Experimentaltumormodell R1H- Rhabdomyosarkom**

Die Untersuchungen an Ratten waren Teil eines Projektes, gefördert durch das Bundesland Sachsen- Anhalt. Hierfür lag das Einverständnis der Tierschutzkommission der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg vor. Die Untersuchungen wurden unter Aufsicht eines Untersuchers durchgeführt (T.K.),

welcher zuvor die entsprechende Fachkenntnis erlangt und die Prüfung zur Durchführung von Tierversuchen abgelegt hatte. Als Experimentaltumor wurde das R1H- Rhabdomyosarkom der Ratte gewählt. Dabei handelte es sich um ein in der Grundlagenforschung etabliertes Tumormodell (Jung et al. 1980, 1990). Die Stammzelllinie R1H ist ein In vivo- In vitro- System, das am Institut für Strahlenbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gehalten und regelmäßig flusszytometrisch und histologisch kontrolliert wurde. Der Primärtumor dieser Zelllinie wurde 1962 durch Röntgenbestrahlung der Kaumuskulatur einer acht Monate alten Ratte des Stammes WAG/Rij erzeugt. Durch weiteres Klonen und Transplantieren wurde 1966 eine stabile Zelllinie gewonnen, das R1-Rhabdomyosarkom. Prof. Dr. rer. nat. Zywietz führte 1976 diesen Tumor als Tumor-Wirt- System in das Institut für Strahlenbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ein. Gegenüber der ursprünglichen Zelllinie unterscheidet sich der Hamburger Tumor im 4-fach erhöhten DNA-Gehalt, so dass der Zelllinie der Buchstabe H für Hamburg angefügt wurde. Folgende zellkinetische Parameter konnten dem Tumor zugeordnet werden (Brammer et al. 1992, Jung et al. 1980, 1981, 1990):

- Zellzyklusdauer: 17,6 Stunden
- Tumorverdopplungszeit bei Volumen  $1,6 \pm 0,2 \text{ cm}^3$ : 4,0 Tage
- Anteil klonogener Zellen: 55%.

Das R1H-Rhabdomyosarkom ist ein solider, mit einer derben Kapsel umgebener Tumor ohne Fernmetastasierungstendenz (Baisch et al. 1990). Das schnelle Tumorstadium, begründet durch eine hohe Mitoserate, führt zur zentralen Nekrose mit vitalem Randsaum.

Die Aufzucht der Ratten und die Implantation der Tumoren wurden im Institut für Strahlenbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Zywietz durchgeführt. Die Haltung im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entsprach den Empfehlungen für Versuchsratten. Die R1H-Rhabdomyosarkomzellen wurden 21-25 Tage vor der Messung subkutan in die rechte Flanke implantiert. Dann wurden die Tiere in standardisierten Behältern auf dem Postweg in den Tierstall der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg überführt

und im Tierstall des Technologiezentrums ZAMED tierschutzgerecht gehalten. Täglich wurde das Tumorwachstum kontrolliert, bis eine Tumorgroße  $>2\text{cm}^3$  erreicht wurde, Abbildung 2.



**Abbildung 2.** R1H- Rhabdomyosarkom (B) auf der WAG/Rij Ratte (A) am 20. Tag nach der Tumortransplantation. Abbildung mit Genehmigung von Prof. Dr. rer. nat. Zywiets.

Die Tiere wurden mittels  $\text{CO}_2$ - Inhalation (Trockeneis) getötet und anschließend dekapitiert. Der Tumor wurde mittels Schere und Skalpell vollständig aus der Flanke präpariert und in frischem Storage-Puffer (pH 7,1) aufbewahrt. Ein Tumorteil wurde für die nachfolgende oxygraphische Messung eisgekühlt (4 Grad Celsius) und der verbleibende Teil im flüssigen Stickstoff bei  $-197$  Grad Celsius aufbewahrt. Des Weiteren wurde ein circa  $1\text{cm}^3$  großes Präparat aus dem Musculus quadriceps der gegenüberliegenden Flanke entnommen und in frischem Storage-Puffer (pH 7,1) aufbewahrt. Gleichzeitig wurden circa  $1\text{cm}^3$  große Proben aus der Leber und der Niere eines Versuchstieres entnommen und wie oben erwähnt behandelt.

Zur Überprüfung der respirometrischen Methoden aus dem Muskellabor auf Tumorgewebe wurden elf tumortragende Ratten untersucht und jeweils ein Biopat aus dem Musculus quadriceps des gegenüberliegenden Laufes entnommen.

Nach Evidenz der respirometrischen Methoden in den Tumorproben sollte die Frage beantwortet werden, ob die respirometrischen Kapazitäten in verschiedenen Tumorabschnitten unterschiedlich sind. Von zusätzlich zwei Ratten wurden die Tumoren in toto exstirpiert. Insgesamt wurden 18 Proben untersucht, neun Proben aus dem Randbereich und neun aus dem Zentrum der Tumoren.

## **2.2 Methoden**

Zur Detektion mitochondrialer Atmungsraten und glykolytischer Enzyme führten wir nachfolgende Untersuchungen aus.

### **2.2.1 Skinned fiber- Technik**

Die von Veksler et al. (1987) erstmals beschriebene Methode der skinned- fiber- Technik („gehäutete Faser“- Technik), die in der Neurologie zur Untersuchung von hereditären Muskelerkrankungen im experimentellen und klinischen Gebrauch routinemäßig Anwendung findet, wurde durch uns versucht, auch auf Tumorgewebe zu übertragen. Nach der Entnahme wurden die Proben bei 4°C in Storage (HEPS)-Puffer, bestehend aus 8,1 mM KEGTA (pH=7,1), 1,9 mM K<sub>2</sub>-Ca-EGTA (freie Kalziumkonzentration 0.1 µM), 9,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Taurin, 5,2 mM ATP, 15 mM Phosphokreatin, 49 mM MES und 20 mM Imidazol, 0,5 mM Dithiothreitol eingebracht. Die Proben wurden danach mit einer Kanülenspitze vorsichtig zerfasert und danach in 2 ml HEPS-Puffer mittels 20 µl Saponin 30 min lang unter leichtem Rühren permeabilisiert und anschließend im Inkubationsmedium dreimal gewaschen, um das Saponin wieder zu entfernen. Die so permeabilisierten Proben wurden auf Filterpapier leicht trocken getupft. Für einen respirometrischen Ansatz wurden etwa 8– 10 mg abgewogen. Ein großer Vorteil dieser skinned fiber- Technik besteht u.a. in der langen zeitlichen Stabilität der Mitochondrien während der Lagerung, die unter sachgemäßer Durchführung bis zu 20 Stunden betragen kann (Sperl et al. 1997).



## 2.2.2 Hochauflösende Respirometrie

### Polarographische Elektroden vom Clark-Typ

Die Sauerstoffkonzentration in einer Mitochondriensuspension oder in Zelllysaten nach Permeabilisierung der Zellmembranen kann mit einer polarographischen Elektrode, z.B. vom "Clark-Typ", gemessen werden. Diese Art der Elektrode arbeitet, indem sie reduzierenden Sauerstoff in Hydroxid umwandelt. Der Strom (mA), der durch den Elektronenfluss erzeugt wird, ist der Sauerstoffkonzentration in der Kammer proportional. Da die Mitochondrien durch Hinzugabe von ADP von Zustand 4 (state 4) in den Zustand 3 (state 3) übergehen, erhöht sich der Sauerstoffverbrauch durch die Arbeit der Atmungskettenkomplexe. Eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer ist die Folge, die dann durch eine Abnahme der Spannung (V) im Oxymeter simultan elektronisch vom Computer aufgezeichnet werden kann.

### Respirometrische Kammern

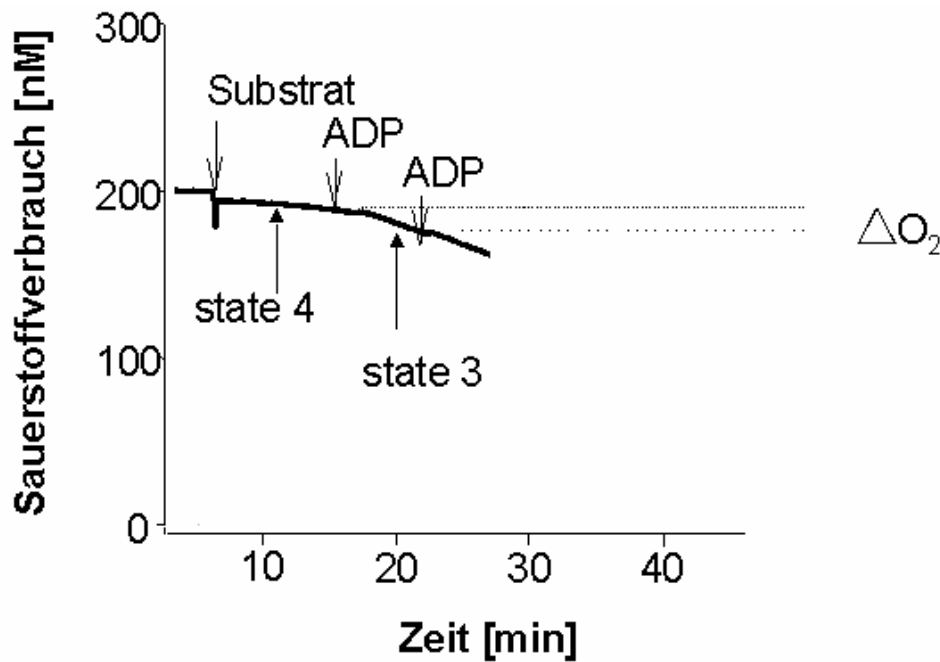
Die Respirometrie wurde bei 30°C im Inkubationsmedium mit dem OROBOROS-Oxygraph- 2K durchgeführt, siehe Abbildung 3.



**Abbildung 3.** Oxygraph OROBOROS, Firma Paar, Graz, Österreich.

Dieser Oxygraph ist ein Zweikammer- Respirometer mit einem Peltier-Thermostat und integrierten, elektromagnetischen Rührern. Für die Versuche wurde jede Kammer luftdicht verschlossen. Das Volumen in der Kammer betrug jeweils 2ml. Befüllt wurden die Kammern über haarfeine Einspritzkanäle mittels Mikrospritzen. Kontinuierlich wurde die Sauerstoffkonzentration der Kammern durch die Clark-Elektroden abgeleitet und die erhaltenen Daten im Anschluss mit der Software DATGRAPH analysiert (OROBOROS, Firma Paar, Graz, Österreich).

Außerordentlich wichtig war es, die Kammern vor jeder Messung ausgiebig zu säubern, um Verschmutzungen durch die sehr wirkungsvollen Hemmstoffe zu vermeiden. Dazu wurden die Kammern mit 75%igem Äthanol gewaschen und mindestens 20 Minuten lang offen gehalten. Im Anschluss wurden die Messzellen noch mindestens fünfmal mit Aqua bidest. ausgewaschen. Es musste weiterhin auf eine mögliche Rückdiffusion des Sauerstoffes in die Kammern geachtet werden. Ein spezielles Testprotokoll lag vor, um den einwandfreien Zustand des Oxygraphen vor der Messung zu ermitteln. Dabei wird durch Hinzugabe von Äthanol eine kurze Zunahme des Sauerstoffgehalts in der Kammer gesehen, da eine höhere Löslichkeit von Sauerstoff in Äthanol als im Wasser beobachtet wird. Jedoch ist auch eine langsame, kontinuierliche Zunahme des Sauerstoffes ein starkes Indiz für eine Rückdiffusion des Sauerstoffes in den Messraum. Die Proben wurden auf ihr Feuchtgewicht, nachdem sie mit Filterpapier zuvor vorsichtig etwas getrocknet worden waren, eingewogen. Zwischen 8- 11 mg des zuvor permeabilisierten Materials wurden für ein Experiment verwendet. Die Sauerstoffkonzentration des in Luft gesättigten Untersuchungsmaterials wurde zu Beginn der Messung immer auf 200 nmol O<sub>2</sub>/ ml bei 95 kPa Luftdruck eingestellt, siehe Messung in Abbildung 4.

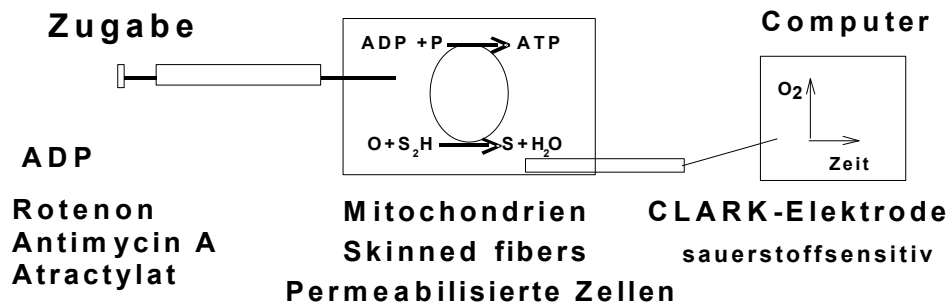


**Abbildung 4.** Typische Atmungskurve eukaryontischer Zellen. ADP: Adenosin- Diphosphat. Substrat: 8-10 mg/ Feuchtgewicht Gewebe.  $\Delta O_2$ : Differenz Sauerstoff, der durch die Atmungskette verbraucht wurde.

### Multiple Substrat- Inhibitor- Technik

Die respirometrischen Messungen erfolgten mittels der multiplen Substrat-Inhibitor-Technik. Zunächst wurden die Proben auf ein Trockengewicht zwischen 8 bis 11 mg eingewogen. Zur Messung wurde ein OROBOROS® Oxygraph (Paar, Graz, Österreich) verwandt. Bei einer Temperatur von 30°C wurden die Proben in 1860µl Inkubationsmedium, das aus 75 mM Mannitol, 25 mM Saccharose, 100 mM KCL, 10 mM  $KH_2PO_4$ , 0,5 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mg/ml Rinderserumalbumin und 20 mM Tris- HCL (pH=7,4) bestand, mit Malat und Pyruvat versetzt und mit einer Pinzette unter optischer Kontrolle in den Oxygraphen eingebracht. Die Sauerstoffkonzentration und Luftsättigung des Mediums wurde auf 200 nmol  $O_2$ / ml und auf 95 kPa Luftdruck gehalten. Verschiedene Substrate (ADP, Succinat) und die entsprechenden Hemmstoffe (Rotenon, Atractylat (CAT), Antimycin A) wurden zugegeben, wobei die Mitochondrien unter kontinuierlichem Sauerstoffverbrauch atmeten. Die Atmungsraten wurden in nmol  $O_2$ / min/ mg Probengewicht gemessen und kontinuierlich über die Zeit (DATGRAPH Analyse Software, OROBOROS®) abgeleitet, siehe Abbildung 5 (Haller et al. 1994, Trubeckaite et al. 2001).

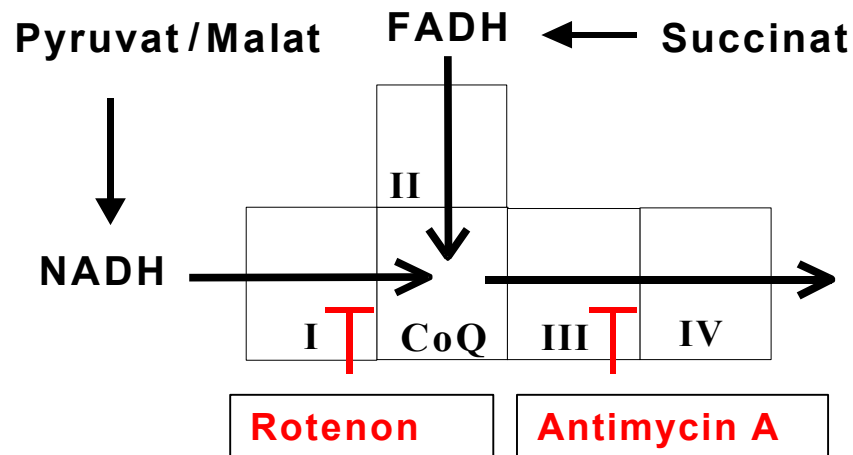
## Oxygraph: geschlossen, rührend, Temperatur (30°C)



**Abbildung 5.** Schematische Darstellung des Aufbaues und der Arbeitsweise des Oxygraphen (OROBOROS<sup>®</sup> Oxygraph Paar, Graz, Österreich). S: Substrat; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; O: Sauerstoff; H: Wasserstoff; H<sub>2</sub>O: Wasser.

Nachdem das Respirometer durch Vorwärmung auf 30°C und Hinzugabe des Inkubationsmediums, was bereits die Substrate Pyruvat + Malat enthält, vorbereitet wurde, wurden die zuvor saponierten Gewebe unter Sichtkontrolle in den Oxygraphen eingebracht. ADP startete die Atmungsreaktion. Durch Zugabe von ADP gehen die Mitochondrien von state 4 in state 3 über. Die state 3- Atmung ist definiert als die maximale Atmungsrate, gemessen unter Bedingungen, wenn ausreichend ADP, Sauerstoff und Substrate vorhanden sind. Die state 3- Atmung wurde bestimmt nach Zugabe von 5 mM ADP. Der Sauerstoffgehalt der Kammer nahm in dem Maße ab, wie die Atmungskette im Komplex I (Pyruvatatmung) stimuliert wurde. Der erste Anstieg mit Erreichen eines Plateaus wird als state 3 für Pyruvat (state 3<sub>PyT</sub>) bezeichnet. Rotenon hemmt irreversibel den Komplex I von seinen Substraten, so dass der Sauerstoffverbrauch der Kammer sinkt und die Atmung zunächst unterbrochen wird. Durch Zugabe von Succinat, das nur in permeabilisierten Zellen in die Mitochondrien gelangen kann, erfolgt die erneute Stimulation der Atmungskettenreaktion auf der Höhe des Komplexes II. Der zweite maximale Zustand der O<sub>2</sub>-Veratmung wird als state 3 für Succinat (state 3<sub>Suc</sub>) bezeichnet. Der respiratorische Flux-Kontrollindex (RCI) beschreibt das Verhältnis aus state 3 und state 4 Atmungsraten. Die state 4- Atmung wurde in der Abwesenheit der ADP-

Phosphorylierung nach Zugabe von 1,8 mM Atractylat gestartet. Die spezifische Hemmung des Komplexes II wurde durch Atractylat-Zugabe (CAT) hervorgerufen. Durch die Hinzugabe von Antimycin A wurde anschließend auch der Komplex III irreversibel gehemmt, siehe Abbildung 6. Die Leak- Atmung, als Differenz zwischen Atractylat- und Antimycin A- Atmung, ist ein Indikator für die Integrität.



**Abbildung 6.** Schematische Darstellung der Substrat – Inhibitor- Titration. Mit schwarz sind die Substrate gekennzeichnet, mit rot die Hemmstoffe der Komplexe. I;II;III,IV: Atmungskomplexe I,II,III,IV; NADH: Nikotin- Adenin- Dinukleotid- Wasserstoff; FADH Flavin- Adenin- Dinukleotid- Wasserstoff; CoQ: Coenzym Q.

### 2.2.3 Herstellung von Gewebehomogenaten

Zur Herstellung eines Muskel- oder Tumorphomogenates wurden die Proben aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut, zwischen 50 und 100mg pro Probe abgewogen und in eisgekühltem Chappel- Perry- Medium im Verhältnis 1:30 (w/v) 7 Minuten per Hand homogenisiert. Das Homogenat verblieb für die anstehenden Messungen eisgekühlt, für einige Komplexenzyme wurden Verdünnungen 1:100 hergestellt und der verbleibende Teil für weitere Messungen wieder in den flüssigen Stickstoff verbracht.

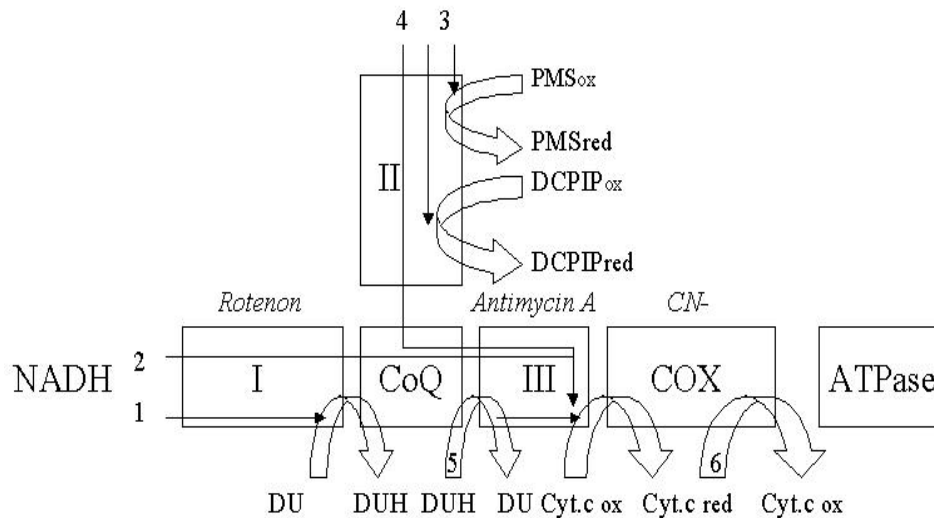
## 2.2.4 Photospektrometrische Messungen

Die Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe und der zytosolischen Enzyme wurden spektralphotometrisch im optischen Test nach Warburg (Warburg 1956) am Spektrometer (Firma Beckmann, Palo Alto, USA) bei 30°C bestimmt. Um eine deutliche lineare Atmungsgeschwindigkeit zu erlangen, wurde Homogenat in der Verdünnung 1:30 und für einige Enzyme 1:100 verwendet. Es wurden Küvetten (Einmal- Küvetten, Plastibrand) mit einer Wanddicke von 10 mm eingesetzt. Das Messvolumen betrug 1 ml und die Inkubationszeit 10 Minuten vor Start der Reaktion. Als Bezugsgrößen dienten das Probengewicht, das Protein oder die Citratsynthase als mitochondriales Leitenzym (Gellerich et al. 1999, Trumbeckaite et al. 2001). Die Enzymaktivitäten wurden nach der unten stehenden Formel berechnet:

$$U/g\ WT = \frac{\Delta E / \text{min} * V_m * F}{\epsilon * V_s}$$

- U/g WT: Einheit pro Gramm Feuchtgewicht
- $\Delta E$ : Änderung der Löschung pro Minute
- $V_m$ : Maßvolumen
- F: Verdünnungsfaktor
- $\epsilon$ : mikromolarer Lösungskoeffizient
- $V_s$ : Probenmenge

Alle Proben wurden pro Enzym einer dreifachen Messung unterzogen, der Mittelwert gebildet und für jede Probe als ein Wert angegeben.



**Abbildung 7.** Metabolisches Schema der Messung der Atmungskettenenzyme I, II, III: Komplex I, II, III. CoQ: Coenzym Q Pool. ATPase: ATPase. *Kursiv:* Hemmstoffe des jeweiligen Komplexes. 1: NADH- Chinon- Oxidoreduktase (Komplex I). 2: Rotenon- sensitive NADH Cytochrom c- Oxidoreduktase. 3: Succinatdehydrogenase. 4: Succinat- Cytochrom c- Oxidoreduktase (Komplex II + Komplex III). 5: Chinon- Cytochrom c- Oxidoreduktase (Komplex III). 6: Cytochrom c- Oxidoreduktase (Komplex IV). DU: Decylubichinon; DUH: Decylubichinol; Cyt. c: Cytochrom c; PMS: Phenazinmetsulphat; DCPIP: Dichlorophenolindophenol; Red: reduziert; Ox: oxidiert.

### Komplex I nach Lenaz

Die Messungen wurden nach den Vorgaben von Estornell et al. (1993) durchgeführt:

Test:

	Leerwert	Wert
KCL- Tris EDTA pH 7,4	965 $\mu$ l	925 $\mu$ l
KCN 100mM	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Antimycin A 200 $\mu$ M	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Homogenat 1:30	0 $\mu$ l	40 $\mu$ l

Inkubationszeit: 10 min bei 30°C

Start:

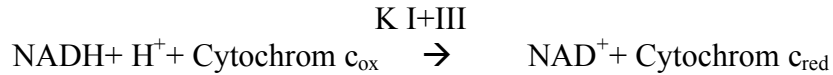
CoQ 6mM	10 $\mu$ l
NADH 10mM	10 $\mu$ l

dann:

Rotenon 1mM	10 $\mu$ l
-------------	------------

Die Reaktion kann bei 340 nm mit einem Extinktionskoeffizienten  $e = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  erfolgen und gemessen werden.

### **Komplexe I+III: NADH- Cytochrom c- Reduktase**



Oxidiertes Cytochrom c wird von NADH über den Komplex I+III reduziert, Abbildung 7. Die Reaktion kann erfolgen nach der Erhöhung der Extinktion des Cytochrom  $c_{\text{red}}$  bei 550 nm ( $e = 19,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Der Verlauf der Reaktion wurde in Anwesenheit von Antimycin A (Hemmung Komplex III) verlangsamt. Die Aktivität des Antimycin A- sensitiven Anteils der NADH- Cytochrom c- Reduktase wird als Antimycin A- sensitive Fraktion der Totalreaktion berechnet, beschrieben bei Hatefi (1978) und Rieske et al. (1967).

Test:

K- Na- Phosphat- Puffer pH 8,0	50 mM
EDTA, pH 8,0	0,1 mM
KCN*	2,5
Cytochrom c 1%	100 $\mu\text{M}$
Homogenat 1:30	20, 40 $\mu\text{l}$
Mit und ohne Antimycin A	20 $\mu\text{l}$

Inkubationszeit: 10 Minuten

Start:

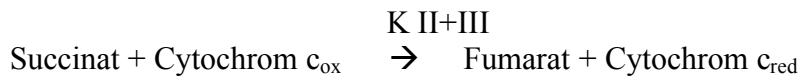
NADH	0,2 mM
------	--------

(\*Lösung sollte jeden Tag frisch vorbereitet werden)

### **Komplex II+III: Succinat- Cytochrom c- Oxidoreduktase**

Die Succinat- Cytochrom c- Oxidoreduktase wurde nach der Methode von Tisdal et al. (1967) gemessen.





Die Reaktion erfolgte durch Reduktion von Cytochrome c bei einer Wellenlänge von 550 nm gefolgt von Cyanid, um die Reoxydation von Cytochrome  $c_{\text{red}}$  und Rotenon zu vermeiden, siehe Abbildung 7. ( $\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Test:

K- Na- Phosphat- Puffer, pH 7,4	50 mM
EDTA, pH 7,4	0,2 mM
BSA 1%	100 $\mu\text{l}$
KCN*	2,5 mM
Homogenat 1:30	20, 40 $\mu\text{l}$

Inkubationszeit: 10 Minuten

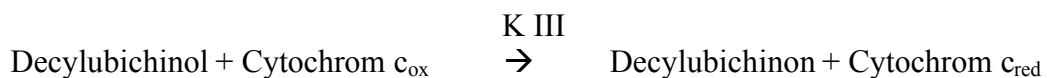
Start:

Cyt c 1%	100 $\mu\text{l}$
----------	-------------------

(\*Lösung sollte jeden Tag frisch vorbereitet werden)

### **Komplex III: Ubichinon- Cytochrom c- Oxidoreduktase**

Die Ubichinon- Cytochrom c- Oxidoreduktase wurde nach der Methode von Krähenbühl et al. (1994) gemessen.



Der Komplex III kann gemessen werden durch Reduktion von Cytochrom  $c_{\text{ox}}$  durch Decylubichinol bei einer Wellenlänge von 550 nm in Anwesenheit von Cyanid zur Verhinderung der Reoxydation von Cytochrom  $c_{\text{red}}$ , siehe Abbildung 7. ( $\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Test:

K- Na- Phosphat- Puffer, pH 8,0	50 mM
EDTA, pH 8,0	0,1 mM
$\text{NaN}_3$	3 mM
Cytochrom c	60 $\mu\text{M}$

Homogenat 1:30 5, 10, 20 µl

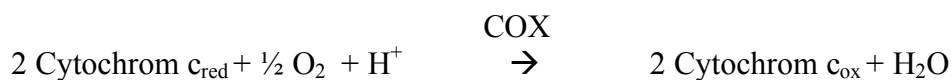
Inkubationszeit: 10 Minuten

Start

Decylubichinol 0.15 mM

### Cytochrom c- Oxidase (COX)

Die Reaktion erfolgt nach Absinken der Cytochrom  $c_{red}$  - Extinktion bei einer Wellenlänge von 550nm, siehe Abbildung 7 ( $\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) nach Wharton & Tzagaloff (1967). Die Aktivität der Cytochrom c- Oxidase wurde berechnet als lineare Reaktion aus 60 µM reduziertem Cytochrom c (90% Reduktion)



Test:

K- Na- Phosphat- Puffer, pH 7,0 10 mM

Cytochrom  $c_{red}$  60 µM

Inkubationszeit: 10 Minuten

Start:

Homogenat 1:30 5, 10, 20 µl

### Succinatdehydrogenase (SDH)

Die SDH wurde bestimmt durch die Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors DCPIP<sub>red</sub> bei einer Wellenlänge 600nm ( $\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).



Test:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 50 mM

EDTA 0,1 mM

KCN\* 2,5 mM

Succinat 4 mM

Homogenat 1:30 20, 40µl

Inkubationszeit: 10 Minuten

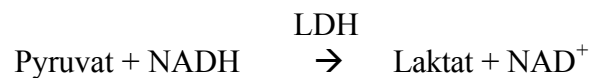
Start:

DCPIP	35 $\mu$ M
PMS*	1,6 $\mu$ M

(\*Lösungen sollten jeden Tag frisch vorbereitet werden)

### **Laktatdehydrogenase (LDH)**

Die LDH wurde nach Bergmeyer (1970) bestimmt.



Die Extinktionsbestimmung kann als Reaktion durch Zugabe von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm erfolgen ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Test:

Tris- HCl, pH 7,4	50 mM
EDTA	5 mM
NADH	0,15 mM
Homogenat 1:60	5, 10, 20 $\mu$ l

Inkubationszeit: 10 Minuten

Start:

Pyruvat*	1,22 mM
----------	---------

(\*Lösung sollte jeden Tag frisch vorbereitet werden)

### **Citratsynthase (CS)**

Coenzym A, ein Produkt der CS, verbindet sich mit DTNB, einem Stoff, der Licht einer Wellenlänge von 412nm absorbiert. Diese Änderung wird durch das Spektrophotometer als  $\Delta E/\text{min}$  ermittelt (Sheperd & Garland 1969).



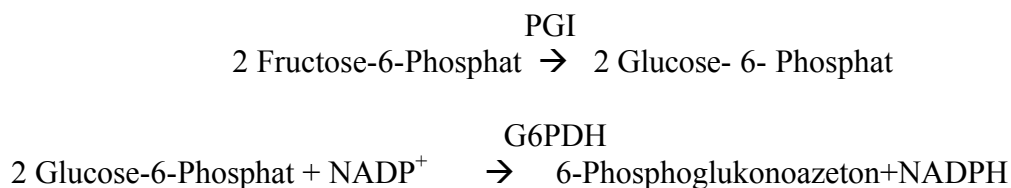
Test:

Tris- HCL, pH 7.4	45.5 mM
DTNB (in 0,1 M Tris-HCL, pH 8,0)	0,1 mM
Acetyl-CoA*	0,1 mM
Homogenat 1:30	10, 20 µl
Start: Oxalazetat*	0,5 mM

(\*Lösungen sollten jeden Tag frisch vorbereitet werden)

### Phosphoglukoisomerase (PGI)

Die PGI wurde nach dem in der Literatur von Bergmeyer (1970) beschriebenen Verfahren bestimmt.



Die Reaktion erfolgt durch Messung der Extinktion von NADPH bei einer Wellenlänge von 340 nm ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Test:

Tris- HCL, pH 8,0	50 mM
EDTA	5 mM
NADP	0,5 mM
G6P-DH	0,7 U/ml
Homogenat 1:100	5, 10, 20 µl
Inkubationszeit: 10 Minuten	

Start:

Fructose-6-Phosphat	2 mM
---------------------	------

### **2.2.5 Proteinanalyse**

Das nichtkollagenierte Protein (NCP) wurde mit der BCA- Probe durch die Lösungen A und B der Firma Perbio Science Deutschland GmbH nach Versetzen des Homogenats mit Natriumhydroxid (50 mM) und Beizen des unlöslichen Kollagenproteins durch Zentrifugieren (12.000 g und 10 Minuten), wie vorher beschrieben, aufgebrochen und bestimmt (Smith & Krohn 1994).

### **2.2.6 Statistik**

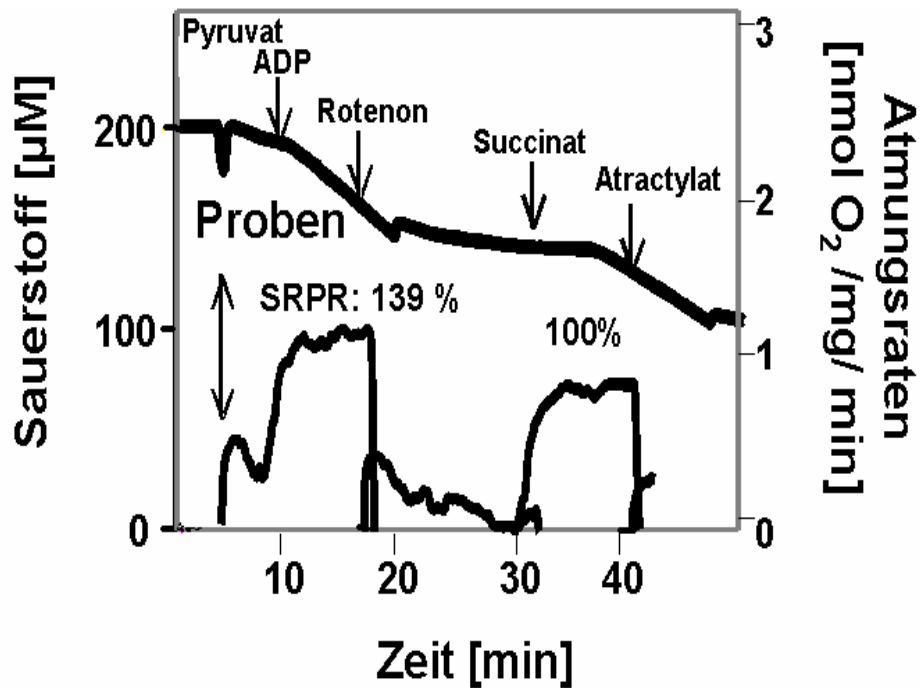
Die Daten wurden mit dem Mann- Withney- Teast (U-Test) und dem Programm SPSS für Windows 11.0 ausgewertet. Alle Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Werte waren signifikant unterschiedlich, wenn ein  $p < 0,05$  auftrat.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Respirometrie und Photospektrometrie der Normalgewebe der Ratte**

Zunächst standen Untersuchungen verschiedener Normalgewebe der Ratte, wie Leber, Niere und Skelettmuskel, an erster Stelle.

Die Abbildung 8 zeigt ein typisches Respirogramm eines Skelettmuskels einer jungen Ratte (Fisher-Ratte). Die state 3- Atmung für Pyruvat überstieg die state 3- Atmung für Succinat. Der Quotient wird als Succinat-bezogene Pyruvatatmung (SRPR) bezeichnet. Rotenon hemmt den Komplex I irreversibel. Für Skelettmuskelfasern ist die Rotenonhemmung des Komplexes I besonders stark nachweisbar.



**Abbildung 8.** Typisches Respirogramm eines Skelettmuskels einer jungen Fisher-Ratte. Die SRPR beträgt 139%. Mit Genehmigung von PD Dr. rer. nat. F. N. Gellerich.

Die Messungen zeigten, dass die Skelettmuskeln der untersuchten jungen Albinoratte mit implantiertem R1H- Rhabdomyosarkom identische Atmungsparameter aufwiesen wie die der jungen Fisher-Ratte, geprüft von Herrn PD Dr. rer. nat. Gellerich.

Die respirometrischen Parameter weiterer Normalgewebe der Ratte wurden zu Charakterisierungszwecken ebenfalls untersucht. Exemplarisch dafür wurden die viszerale Organe Leber und Niere überprüft. Dabei wiesen das Leber- und Nierengewebe jeweils dreifach und doppelt so viele Mitochondrien pro Zelle auf, wie die Skelettmuskulatur, was anhand der Citratsynthaseaktivität (CS) ableitbar ist, siehe Tabelle 1.

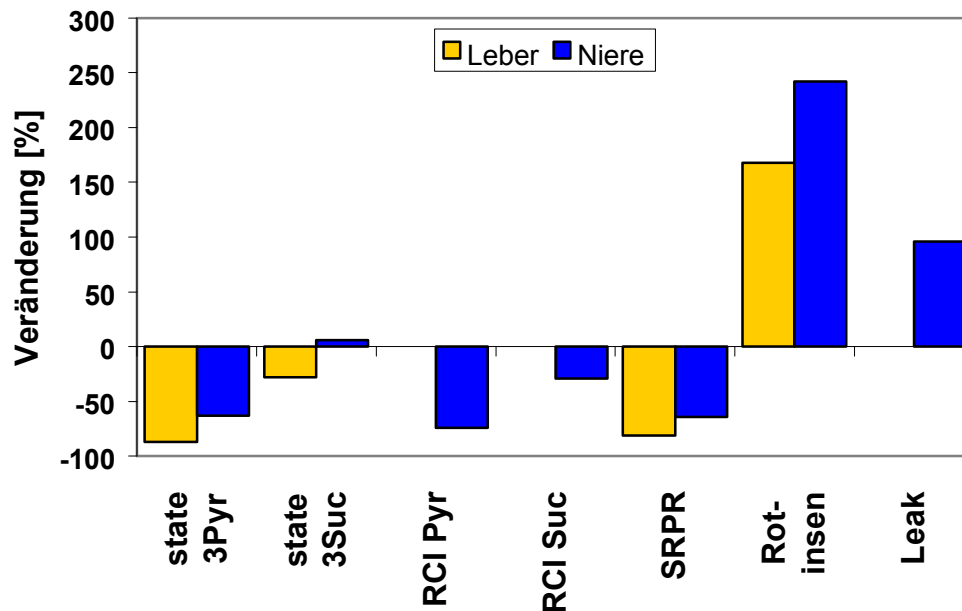
**Tabelle 1.** Atmungsraten von Normalgeweben der Ratte von 2 Tieren. Die Atmungsraten unter # wurden mit nmolO<sub>2</sub>/mg/min ± Standardabweichung angegeben. Die Untersuchung der Leberproben konnte nicht vollständig erfolgen, da die O<sub>2</sub>- Konzentration in der Kammer bereits nach der Messung von state 3<sub>pyr</sub> auf null abgesunken war. CS: Citratsynthase; NO: Komplex I – Oxidase.

<b>Funktion /Enzym</b>	<b>Leber N=2</b>	<b>Niere N=2</b>	<b>Skelettmuskel N=11</b>
#State 3 <sub>pyr</sub>	0,97 ± 0,03	1,8 ± 0,84	2,32 ± 1.19
#State 3 <sub>pyr</sub> / CS	20	58	155 ± 70
#SR- Rotenon- insensitiv	51 ± 0,02	65 ± 13	19 ± 11
#State 3 <sub>suc</sub>	3,5 ± 0,7	3,4 ± 2,84	1,55 ± 0.63
#State 3 <sub>suc</sub> / CS	74	109	103 ± 38
#Atractylat/ CS	-	29	0,39 ± 0.14
#Leak Atmung	-	1,72	0,42 ± 0.09
#Leak Atmung/ CS	-	55	28 ± 8
SRPR [%/ CS]	28 ± 0,07	53	145 ± 56
#RCI (state 3 <sub>pyr</sub> )	-	1,05	4,07 ± 3,07
#RCI (state 3 <sub>suc</sub> )	-	1,98	2,77 ± 1,11
CS [U/g Gewebe]	47,5	31	15,0 ± 2,8
COX [%/ CS]	63	27	60 ± 17
III [%CS]	87	27	182 ± 67
II+III [%/ CS]	38	27	23 ± 7
I+III [%/ CS]	33	91	4 ± 2
Rotenon- insensitive NO [%]*	65	140	80 ± 7
SRNO [%]*	87	337	22 ± 13
SDH [%/ CS]	70	140	28 ± 7
PGI [%/ CS]	2140	9910	1551 ± 734

\* Werte berechnet von Komplex I+III

Um die Atmungsraten absolut vergleichen zu können, mussten alle Messungen auf die Citratsynthase (CS) bezogen werden, die ein Maß für den absoluten Mitochondriengehalt in der Zelle darstellt.

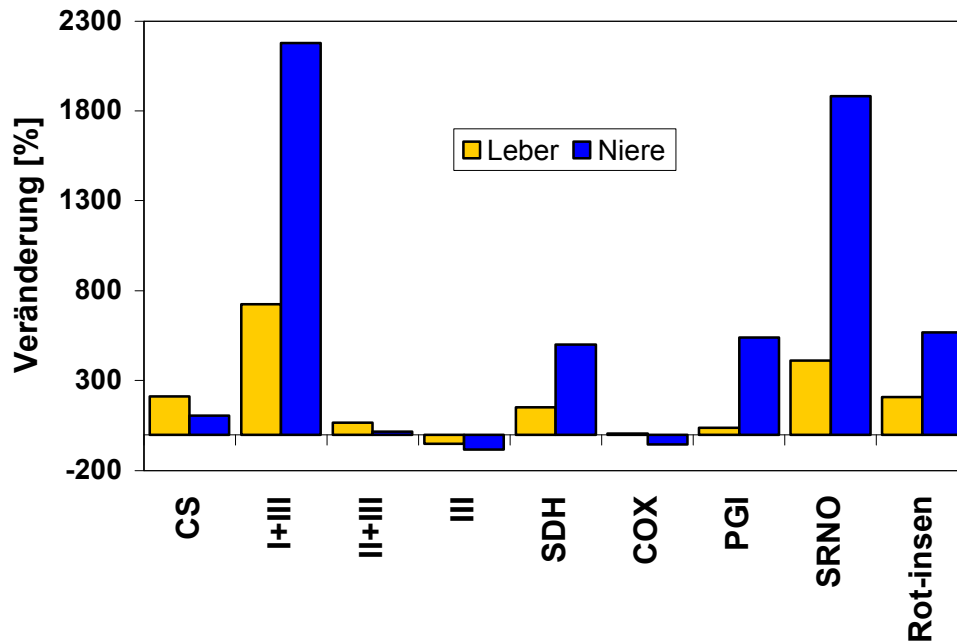
Leber- und Nierengewebe wiesen deutlich verminderte Atmungsraten für Pyruvat auf (state  $3_{\text{Pyr}}$ ). Diese Reduktion im Vergleich zum Skelettmuskel war repräsentativ, auch im Verhältnis zur Anzahl der Mitochondrien, siehe Abbildung 9 und 10.



**Abbildung 9.** Veränderung der respirometrischen Parameter der Mitochondrien in Leber und Niere im Vergleich zum Muskulus quadriceps der Ratte in Prozent.  $\text{RCI}_{\text{Pyr}}$ : Flux- Kontroll- Koeffizient für Pyruvat;  $\text{RCI}_{\text{Suc}}$ : Flux- Kontroll Koeffizient für Succinat; SRPR: Succinat-bezogene Pyruvatatmung, Rot-insen: Pyruvat-bezogene Rotenon-insensitive Atmung; Leak: Leckatmung.

Die photospektrometrisch gemessenen Enzymaktivitäten im Leber- und Nierengewebe wiesen gleichfalls deutliche Unterschiede im Vergleich zu den normalen Skelettmuskeln auf, siehe Abbildung 10.



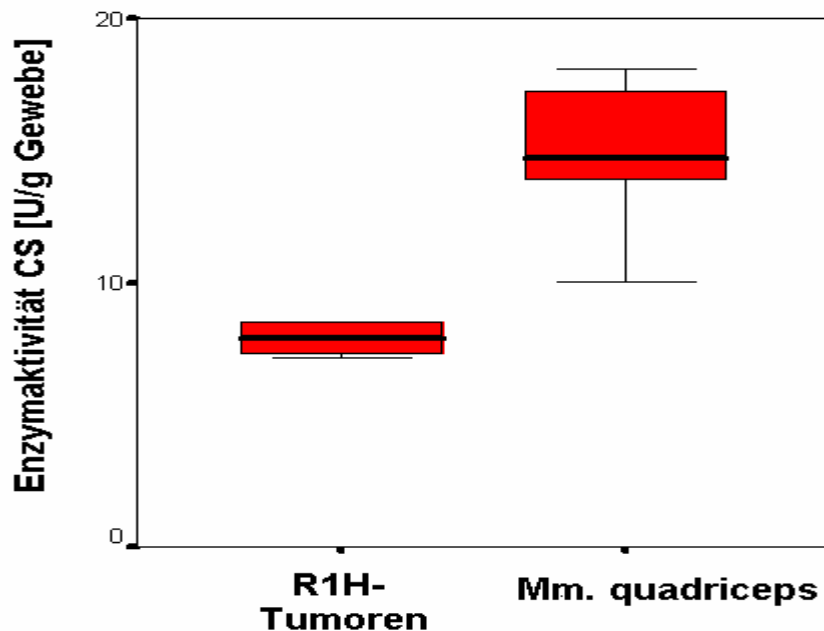


**Abbildung 10.** Veränderung der enzymatischen Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe der Mitochondrien in Leber und Niere im Vergleich zum Muskulus quadriceps der Ratte in Prozent. CS: Citratsynthase; I+III: Komplex I+III, II+III: Komplex II+III; III: Komplex III; SDH: Succinatdehydrogenase; COX: Cytochromoxidase; PGI: Phosphoglukoisomerase; SRNO: Succinat-bezogene NADH – Oxidase; Rot-insen: Pyruvat-bezogene Rotenon- insensitive Atmung.

### 3.2 Respirometrie der R1H- Rhabdomyosarkome

Die respirometrischen Kapazitäten der R1H-Rhabdomyosarkome waren signifikant gegenüber den Kapazitäten der Skelettmuskeln vermindert, siehe Abbildung 11. Die Aktivitäten der Tumorzellen lagen lediglich im Bereich  $\mu\text{mol O}_2 / \text{min} / \text{mg}$  Gewebegewicht, während die der Muskelzellen in  $\text{nmol O}_2 / \text{min} / \text{mg}$  gemessen wurden. Um zu entscheiden, ob es sich auch um Defekte der Komplexe selbst handeln könnte, wurden die Aktivitäten wieder auf die Citratsynthase (CS)-Aktivität bezogen. Die photospektrometrischen Untersuchungen konnten signifikant verminderte CS-Aktivitäten der Tumorzellen im Vergleich zu den Skelettmuskelzellen zeigen (CS-Aktivität R1H- Rhabdomyosarkom vs. Skelettmuskel  $7,1 \pm 2,4$ . vs.  $15,0 \pm 2,8$  U/g Gewebe,  $p < 0,001$ ). Danach waren wesentlich weniger Mitochondrien in den R1H-Rhabdomyosarkomen als in den Skelettmuskeln vorhanden. Die respirometrischen Kapazitäten wurden nun

nochmalig auch durch Bildung von Verhältnisgleichungen einzeln untersucht. Die Ergebnisse fasst die Tabelle 2 zusammen.

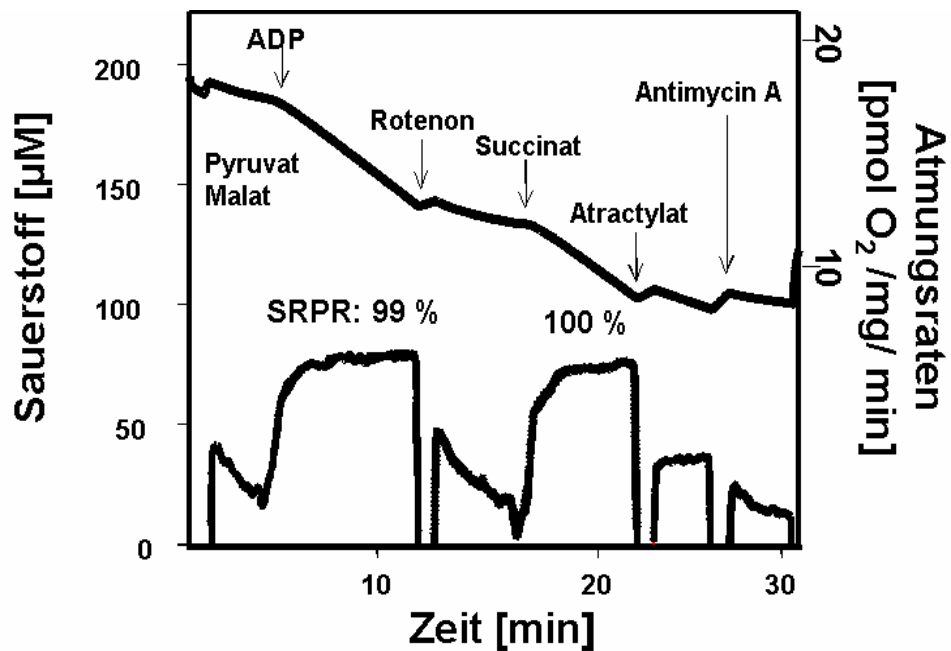


**Abbildung 11.** Aktivität der Citratsynthase (CS) von R1H- Rhabdomyosarkomen im Vergleich zu Skelettmuskeln der Ratte. In den R1H-Rhabdomyosarkomen liegt nur die Hälfte an Mitochondrien im Vergleich zu den Skelettmuskeln vor. Der Unterschied war mit  $p < 0,001$  signifikant.

Neben der signifikanten Verminderung der CS konnte auch eine SRPR-Verminderung (R1H- Rhabdomyosarkom vs. Skelettmuskel  $56,4 \pm 25$  vs.  $145 \pm 56\%$ ,  $p < 0,001$ ) gezeigt werden. Die RCI waren im R1H-Rhabdomyosarkom sowohl für Pyruvat ( $0,78 \pm 0,45$  vs.  $4,07 \pm 3,07$ ,  $p < 0,001$ ) als auch für Succinat ( $1,40 \pm 0,24$  vs.  $2,77 \pm 1,11$ ,  $p < 0,002$ ) erniedrigt. Des Weiteren konnte eine verminderte Hemmbarkeit des Komplexes I mit Rotenon im Rhabdomyosarkom (R1H-Rhabdomyosarkom vs. Skelettmuskel  $36 \pm 14$  vs.  $19 \pm 11\%$ ,  $p < 0,001$ ) eindeutig nachgewiesen werden. Die Tumorzellen waren signifikant weniger auf Rotenon empfindlich, was durch eine erhöhte Rotenon-Insensitivität sichtbar wurde (Rotenon-Insensitivität = Pyruvatatmung – Rotenon-sensitive Atmung). Die Atractylatatmung (CAT- Atmung) war dagegen in den R1H- Tumoren mehr als doppelt so hoch wie im Muskelgewebe (R1H-Rhabdomyosarkom vs. Skelettmuskel  $0,97 \pm 0,43$  vs.  $0,39 \pm$

0,14,  $p < 0,001$ ). Ebenso konnte eine signifikant höhere Leakatmung (Leakatmung = CAT- Atmung – Antimycin A- Atmung) in den R1H- Tumoren gemessen werden, bezogen auf die Citratsynthase (R1H-Rhabdomyosarkom vs. Skelettmuskel  $59 \pm 36$  vs.  $28 \pm 8$ ,  $p < 0,021$ ).

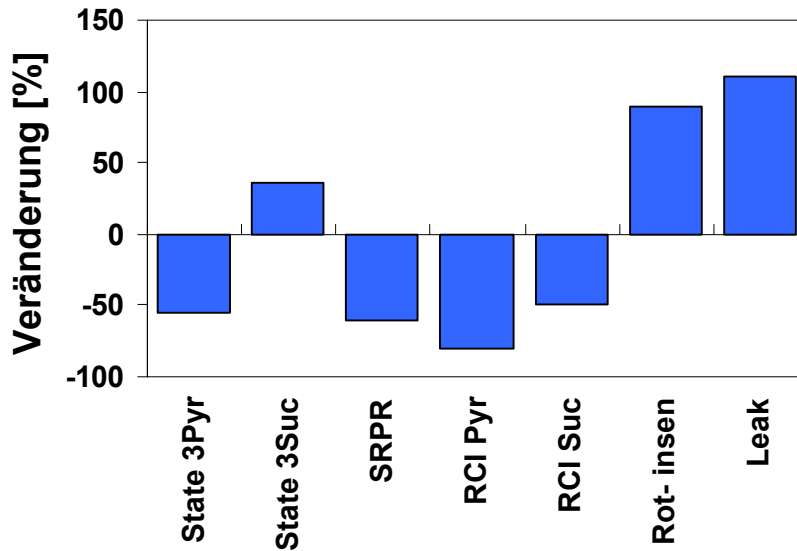
Die Abbildung 12 zeigt ein typisches Respirogramm eines R1H-Rhabdomyosarkoms der Ratte. Im Vergleich zum Skelettmuskel besteht eine signifikant niedrigere SRPR.



**Abbildung 12.** Beispiel einer respirometrischen Messung eines R1H-Rhabdomyosarkoms der Ratte. Die Succinat bezogene Pyruvatatmung (SRPR) dieses Tumors betrug nur 99%.

**Tabelle 2.** Vergleich der Atmungsraten des R1H- Rhabdomyosarkoms zum Skelettmuskel der Ratte. Die Werte # wurden in nmolO<sub>2</sub>/mg/min und Enzymaktivitäten \* in % CS-Aktivität der einzelnen Enzyme der Atmungskomplexe und des Zitratzyklus angegeben. Die Angaben erfolgten in  $\pm$  Standardabweichung. n.s.: Werte sind nicht mit einem  $p < 0.05$  signifikant verschieden.

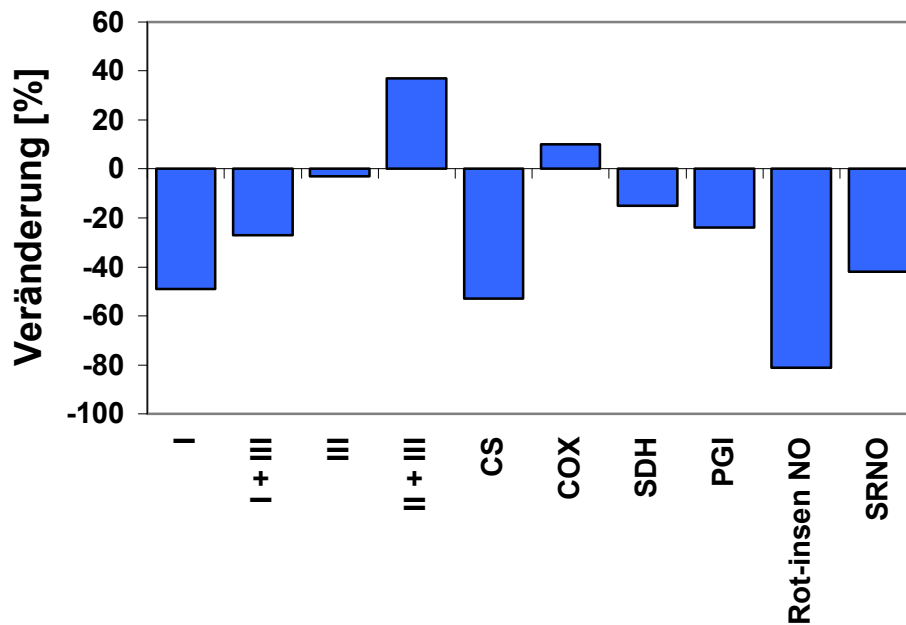
<b>Funktion /Enzym</b>	<b>Rhabdomyo- sarkom n=11</b>	<b>Skelett- muskel n=11</b>	<b>Verän- derung [%]</b>	<b>Signifi-kanz p</b>
# State 3 <sub>Pyr</sub>	0,56 $\pm$ 0,28	2,32 $\pm$ 1,19	24	0,0001
# State 3 <sub>Pyr</sub> / CS	70 $\pm$ 38	155 $\pm$ 70	45	0,002
SR-Rotenon- insen. [%]	36 $\pm$ 14	19 $\pm$ 11	189	0,001
#State 3 <sub>Succ</sub>	1,00 $\pm$ 0,29	1,55 $\pm$ 0,63	64	0,001
# State 3 <sub>Succ</sub> / CS	140 $\pm$ 59	103 $\pm$ 38	136	n.s.
#Atractylat/ CS	0,97 $\pm$ 0,43	0,39 $\pm$ 0,14	249	0,001
#Leak Atmung	0,41 $\pm$ 0,20	0,42 $\pm$ 0,09	98	0,025
#Leak Atmung/ CS	58,6 $\pm$ 36,2	27,8 $\pm$ 8,3	210	0,021
SRPR [%/ CS]	56 $\pm$ 25	145 $\pm$ 56	39	0,001
RCI (state 3 <sub>Pyr</sub> )	0,78 $\pm$ 0,45	4,07 $\pm$ 3,07	19	0,001
RCI (state 3 <sub>Succ</sub> )	1,40 $\pm$ 0,24	2,77 $\pm$ 1,11	51	0,002
CS [U/g Gewebe]	7,1 $\pm$ 2,4	15,0 $\pm$ 2,8	47	0,001
COX [%/ CS]	71 $\pm$ 30	60 $\pm$ 17	110	n.s.
III [%/ CS]	176 $\pm$ 68	182 $\pm$ 67	97	n.s.
II + III [%/ CS]	31 $\pm$ 19	23 $\pm$ 7	137	n.s.
I+III [%/ CS]	3 $\pm$ 4	4 $\pm$ 2	73	n.s.
Rotenon- insen. NO[%]	15 $\pm$ 8	80 $\pm$ 7	19	0,001
I [%/ CS]	6 $\pm$ 3	12 $\pm$ 4	51	0,018
SRNO [%]	13 $\pm$ 11	22 $\pm$ 13	58	n.s.
SDH [%/ CS]	24 $\pm$ 5	28 $\pm$ 7	85	n.s.
PGI [%/ CS]	1172 $\pm$ 821	1551 $\pm$ 734	76	n.s.



**Abbildung 13.** Veränderung der respirometrischen Parameter der Tumormitochondrien des R1H- Rhabdomyosarkoms im Vergleich zum Skelettmuskel in Prozent. RCI<sub>Pyr</sub>: Fluxkontrollkoeffizient für Pyruvat; RCI<sub>Suc</sub>: Fluxkontrolleffizient für Succinat; SRPR: Succinat bezogene Pyruvatatmung; Rot- insen: Pyruvat bezogene Rotenon- insensitive Atmung; Leak: Leckatmung.

### 3.3 Photospektrometrie der R1H- Rhabdomyosarkome

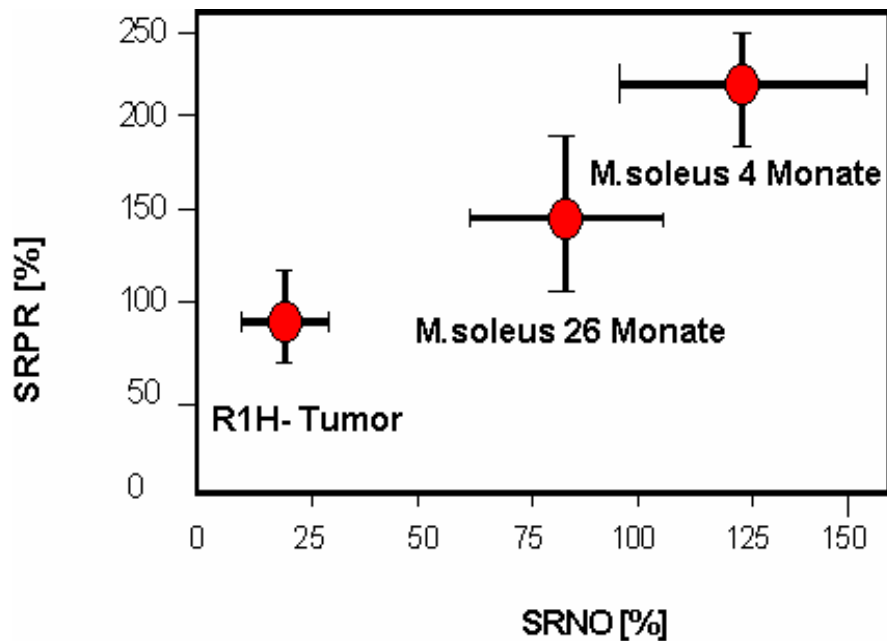
Die veränderten mitochondrialen respirometrischen Kapazitäten im R1H- Rhabdomyosarkom im Vergleich zum Skelettmuskel konnten auch enzymkinetisch-photospektrometrisch bestätigt werden, wobei insbesondere die Aktivität von Komplex I deutlich vermindert war. So war der Komplex I/ CS in der Messung nach Lenaz mit  $6 \pm 3\%$  versus  $12 \pm 4\%$  im R1H- Tumor im Vergleich zum Muskel signifikant vermindert,  $p= 0,018$ . Da sich im Gegensatz dazu die Aktivität von Komplex II+III sogar erhöhte, wurde die verminderte Aktivität von Komplex I und Komplex I+III durch Quotientenbildung (Komplex I+III/ Komplex II+III) besonders deutlich mit einer SRNO von  $13 \pm 11\%$  im Tumor gegenüber  $22 \pm 13\%$  im Skelettmuskel (im statistischen Vergleich nicht signifikant).



**Abbildung 14.** Veränderung der photospektrometrisch ermittelten enzymatischen Komplexaktivitäten der Tumormitochondrien im Vergleich zum Skelettmuskel in Prozent. Die Intaktheit des Komplexes II und die Komplex I- Störung im Tumorgewebe konnten auch mittels photospektrometrischer Aktivitätsmessung bewiesen werden (Komplex I+III und SRNO signifikant erniedrigt). Etwas im Widerspruch steht die verminderte PGI im Tumor im Vergleich zum Muskelgewebe. CS: Citratsynthase; I+III: Komplex I+III, II+III: Komplex II+III; III: Komplex III; SDH: Succinatdehydrogenase; COX: Cytochromoxidase; PGI: Phosphoglukoisomerase; SRNO: Succinat- bezogene NADH – Oxidase; Rotinsen: Pyruvat-bezogene Rotenon- insensitive Atmung.

### 3.4. Einfluss von Alter und Tumormikromilieu auf die Zellatmung

Die Abbildung 15 zeigt altersabhängige Veränderungen der Atmungskapazitäten von verschiedenen alten Rattenmuskeln\* im Vergleich zum R1H- Rhabdomyosarkom. Mit zunehmendem Alter sinken die Atmungsraten auch in den Skelettmuskeln deutlich ab. Diese relative Verminderung von Komplex I geht parallel mit der Verminderung der relativen Pyruvatatmung (SRPR) einher und ist wahrscheinlich deren Ursache.



**Abbildung 15.** Succinat-bezogene Pyruvatatmung (SRPR) gegenüber Succinat- bezogener Komplex I- abhängiger Oxidation (SRNO). Vergleich des R1H- Tumors mit Skelettmuskelzellen einer 4 Monate und einer 26 Monate alten Fisher- Ratte (Gellerich et al.). Die R1H- Tumoren wiesen die niedrigsten Quotienten auf und hatten somit die geringsten Komplex I- Aktivitäten. \*Die Untersuchungsergebnisse der verschiedenen alten Skelettmuskeln von Fisher-Ratten stammen aus Untersuchungen von Herrn PD Dr. rer. nat. F.N. Gellerich mit seiner ausdrücklichen Genehmigung.

Im Randbereich und aus dem Tumorzentrum wurden jeweils neun Proben von zwei R1H- Tumoren untersucht. Die Proben aus dem Tumorzentrum wurden direkt aus den bereits makroskopisch als Nekrosezone ausgewiesenen Gebieten entnommen. Die Ergebnisse fasst die Tabelle 3 zusammen.

**Tabelle 3.** Messwerte der state 3- Atmung des R1H- Rhabdomyosarkoms in verschiedenen Tumorbereichen. Zwei Tumoren wurden im Randbereich (9 Proben) und im Tumorzentrum (9 Proben) gemessen. Im Trend, jedoch nicht signifikant verschieden, wurden im Zentrum des R1H- Rhabdomyosarkoms höhere Atmungsraten für Pyruvat gemessen. Die Änderungen wurden vom Randbereich bezogen auf das Zentrum in Prozent angeben. Werte mit Angabe der Standardabweichung.

Enzyme J-O <sub>2</sub> /mg/min	Tumorrand (n=9)	Tumorzentrum (n=9)	Änderung %
State 3 <sub>Pyr</sub> *	16,8 ± 6,7	20,2 ± 3,1	- 17
State 3 <sub>Suc</sub> *	19,2 ± 5,2	20,7 ± 2,9	- 7
SRPR (%)*	88,2 ± 15	97 ± 11	- 9

\*Werte von 2 Tumoren gemessen, nicht auf CS geeicht.

Die mittlere Pyruvatatmung war im Randbereich gegenüber dem Zentrum mit  $16,8 \pm 6,7$  vs.  $20,2 \pm 3,1$  J-O<sub>2</sub>/mg/min leicht vermindert. Dagegen war die Succinatatmung im Randbereich mit  $19,2 \pm 5,2$  vs.  $20,7 \pm 2,9$  J-O<sub>2</sub>/mg/min unverändert, weshalb die SRPR im Randbereich tendenziell mit  $88,2 \pm 15\%$  gegenüber  $97 \pm 11\%$  vermindert war.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Mitochondriale Medizin**

Seit langem ist die zentrale Rolle der Mitochondrien im Zellstoffwechsel bekannt. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden, unter anderem durch Otto Warburg, die Vorgänge der Zellatmung erforscht (Warburg 1956). Je nach Energiebedarf schwankt die Anzahl von Mitochondrien zwischen den verschiedenen Zellarten. Hautzellen besitzen nur circa ein Dutzend, Herz, Leber und Nieren dagegen mehrere tausend Mitochondrien. Die Erzeugung von ATP aus ADP ist in den eukaryontischen Säugerzellen an die in der inneren Mitochondrienmembran eingebetteten Atmungskettenkomplexe I bis IV gekoppelt. In rascher Folge wurden weitere Funktionen, wie z. B. die Beta- Oxidation der Fette, der Zitratzyklus sowie die Biosynthesen der Pyrimidine, Aminosäuren, Phospholipide oder auch der Nukleotide bekannt. Zunächst wurde die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) von ADP zu ATP als wichtigste Funktion der Mitochondrien angesehen. Mitochondrial bedingte Störungen des Zellstoffwechsels wurden danach über pathologische Verminderungen der zytosolischen Phosphorylierungspotentiale erklärt, welche Hemmungen der ATP-nutzenden Reaktionen bewirken.

In den letzten Jahren sind neue originäre Aufgaben der Mitochondrien bekannt geworden (Luft 1995). Da sind zum einen spezifische Synthesen, wie z.B. die Hydrierung von Dehydroorotsäure an der mitochondrialen Innenmembran. Eine Störung bewirkt die Beeinträchtigung der Synthese von Pyrimidinnukleotiden, die zu schweren Veränderungen des Proteinbesatzes der Zelle führen (Löffler et al. 1997). Zum anderen ist inzwischen unstrittig, dass die Mitochondrien Kalzium reversibel



aufnehmen können, und dass die Mitochondrien somit über phosphorylierungspotential- abhängige Wechselwirkungen hinaus aktiv das Kalzium-Signaling beeinflussen können (Gunter et al. 2000, Jouaville et al. 1995, Wussling et al. 1999). Seit den fünfziger und sechziger Jahren ist der kausale Zusammenhang zwischen der akuten Ischämie und mitochondrialen Funktionsstörungen bekannt (Jennings et al. 1969). Die Untersuchungen auf diesem Gebiet führten zur Etablierung der modernen Transplantationsmedizin.

Im Jahr 1962 begann mit der Entdeckung der mitochondrialen Erkrankung eine rasante Entwicklung in der pathologischen Biochemie (Luft 1962). Ende der 80er gelang der Nachweis, dass Mutationen der mtDNA dafür verantwortlich sind (Holt et al. 1988, Wallace et al. 1988). So führte das zunehmende Wissen über die Rolle der Mitochondrien bei vielen Erkrankungen zur Etablierung der mitochondrialen Medizin (Dahl & Thorburn 2001, Luft 1995, Larsson & Luft 1999). Mittlerweile wurden über 50 Erkrankungen beschrieben, die ursächlich auf spezifische Mutationen der mtDNA oder der nDNA zurück zu führen sind (Chinnery & Turnbull 1999). Einen Überblick über die Entwicklungen in der mitochondrialen Medizin gibt die Tabelle 4.

**Tabelle 4.** Übersicht über die Geschichte der mitochondrialen Medizin.

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Entdeckung</b>
Luft	1962	Beschreibung des ersten Falles einer 35- jährigen euthyreoten Frau mit extrem hohem Stoffwechsel und stark erhöhter Anzahl und Größe der Mitochondrien der Muskulatur.
Engel	1963	Beschreibung der histochemischen Gomori Trichrome-Färbung für Muskeln zur Identifikation der „ragged red fibers“.
	zwischen 1970- 80	Debatte über Syndrome mit zwei konträren Positionen, über deren Zusammengehörigkeit (Position der „lumpers“) oder deren Eigenständigkeit (Position der „splitters“) z.B. KSS/ progressive Ophthalmoplegie.
Crumrine & Königsberger	1975	Beschreibung des 1. Falles der MELAS.
Anderson	1981	Entschlüsselung der mtDNA.
Werneck & Di Mauro	1985	Erster Carnitin- Palmitoyl- Transferase (CPT)- Mangel beschreiben.
	seit 1990	Beschreibung von über 50 mitochondrialen Erkrankungen (mitochondriale Zytopathien) zumeist auf der Basis genetischer Defekte. Mit dem besseren Verständnis der Grundlagen wird die Zahl weiter steigen.

Zunehmendes Verständnis über die Mechanismen der unterschiedlichen mitochondrialen Genetik, die sich in verschiedenen Genotyp/ Phänotyp-Veränderungen auswirken, wurden aus Tiermodellen gewonnen. Genotyp/ Phänotyp-Veränderungen, Heteroplasmie oder so genannte „common deletions“, die mit verschiedenen Syndromen (Plus- Syndromen) vergesellschaftet sind, konnten auch beim Menschen verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen zugeordnet werden (Chinnery et al. 2001b, Schapira 1998). Die häufigsten Erkrankungen dieses Formenkreises sind die MELAS, LUFT'sche Erkrankung, M. Alzheimer und andere (Chinnery & Turnbull 2001a). Als Auslöser dieser Erkrankungen werden zum Teil die nachgewiesenen mtDNA- Mutationen angesehen. Durch die spezielle mitochondriale Genetik überträgt sich jedoch nicht jede mtDNA- Mutation auf die Proteinebene und führt zur Funktionseinschränkung der Zelle. Nur Homoplasmie, bei der jedes Mitochondrium der Zelle Träger der spezifischen Mutation ist oder bei Heteroplasmie im hohen Grade, bei der der überwiegende Teil, z.B. mehr als 60% COX- Defizienzen, aller Mitochondrien einer Zelle diese Mutation aufweist, kommt es auch zum nachweisbaren Funktionsverlust und damit zum Krankheitsausbruch (Shoubridge 2001a).

Die Mitochondrieninnenmembran, speziell die fünf Atmungskettenkomplexe, stehen auch im Mittelpunkt von Zellalterungsprozessen (Lee & Wei 2005). Wichtige Erkenntnisse über Mechanismen von Zellalterung und programmiertem Zelltod liefern Untersuchungen an Fadenwürmern (*Caenorhabditis elegans*) oder an „Knockout- Mäusen“. So zum Beispiel führt bei *Caenorhabditis elegans* die *mev-1* Mutation zu Veränderungen in der SDH- Untereinheit im Komplex II mit schweren Störungen der Elektronentransportkette, die zu einer vorzeitigen Alterung beitragen (Ishii et al. 1998). Homozygote „Knockout- Mäuse“ für das *Ant-1*- Gen (*Ant -/-*) führen zur Laktatazidose, zu mitochondrialer Myo- und Kardiomyopathie (Graham et al. 1997). Beim Menschen werden die Mutationen in den nDNA- Genen des *Ant-1* als Syndrom der progressiven externen Ophthalmoplegie (PEO) bezeichnet (Suomalainen et al. 1997). Nachgewiesenermaßen sind die Atmungskettenkomplexe I und III Hauptentstehungsorte der endogenen, mitochondrialen ROS (reactive oxygen species). Durch die zeitabhängige Einwirkung der ROS kommt es zur Akkumulation von zahlreichen Mutationen in der mtDNA, die in enger örtlicher Beziehung zu den Atmungskettenkomplexen steht (extrinsischer Faktor der Zellalterung). Die Entstehung

intrazellulärer ROS kann unterschiedliche Effekte auslösen. Niedrige Konzentrationen von ROS zum Beispiel führen zur Zellproliferation, höhere zur Apoptose und höchste Konzentrationen zur Nekrose (Deshpande et al. 2000, Li et al. 2003).

Neben den genetisch bedingten, hereditären mitochondrialen Erkrankungen gibt es auch durch akute oder chronische Ereignisse ausgelöste mitochondriale Störungen (DiMauro 2001a, DiMauro 2001b). Ein aktuelles Beispiel dafür wäre die Sepsis (Trumbeckaite et al. 2001). Der Einfluss von chronischer Hypoxie gelang unter anderem am Herzen, am Hirn oder bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (Nouette-Gaulain et al. 2005, Zullo et al. 1999). Das Rauchen spielte dabei als Kofaktor eine entscheidende negative Rolle.

Aus beiden, aus nDNA und mtDNA- Genomen, werden die strukturellen Komponenten (Proteine) der Atmungskettenkomplexe kodiert. In den letzten Jahren wurden neben der Erforschung der mtDNA- Mutationen auch Mutationen der nDNA als Ursachen funktioneller Störungen der Atmungskette bekannt (Smeitink et al. 1998). Die Mehrzahl der Erkrankungen treten im Erwachsenenalter auf und werden autosomal rezessiv vererbt. Bei Kindern verlaufen diese Erkrankungen oft tödlich. Bei Erwachsenen sind mildere Verläufe die Regel. Sie gehen zumeist mit multiplen mtDNA- Mutationen einher (Shoubridge 2001). Unter anderem sind Defizienzen bekannt, die mehrere Atmungskettenkomplexe betreffen. Beim Leigh's Syndrom ist der Komplex I durch eine Mutation der *AQDQ* Untereinheit auf Chromosom 5 und der Komplex IV durch Mutation des *SURF-I*-Gens auf Chromosom 9q1 deletiert. Bei der optischen Atrophie und Ataxie liegt ursächlich eine Komplex II- Störung durch eine Mutation der *Fp*- Untereinheit des SDH auf Chromosomen 3 vor. Meulemans et al. (2004) konnten bei Kindern mit funktionell nachgewiesenem Komplex-I-Defekt keine der typischen mtDNA-Mutationen nachweisen. Die insgesamt 96 verschiedenen Nukleotidveränderungen wiesen auf einen Defekt nukleär kodierter Gene hin.

In malignen Tumoren fielen die geänderte Größe, Form, Menge und Tätigkeit von Mitochondrien morphologisch und funktionell auf (Cuezva et al. 2002, Eble et al. 1984, Ebner et al. 1991). Mitochondrien von schnell wachsenden Tumoren neigen

dazu, weniger und kleinere Mitochondrien mit wenigen Cristae zu besitzen im Vergleich zu Mitochondrien langsam wachsender Tumoren (Eble & Hull 1984, Ebner et al. 1991, Peluso et al. 2000). Gutartige Tumoren der Schilddrüse, der Speicheldrüsen, der Niere, der Nebenschilddrüse und der Brustdrüse zeichnen sich durch außergewöhnlich viele Mitochondrien mit einem hohen Anteil oxidierender Enzyme aus (Maximo et al. 2000).

Da die Bestimmung hypoxischer Marker und Mikromilieubedingungen von Kopf-Hals-Tumoren und Zervixkarzinomen einen Schwerpunkt der klinischen Forschung der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg darstellten, lag es nahe, auch Untersuchungen zur Mitochondrienfunktion an diesen Tumoren durchzuführen. Es wurde ein fachübergreifendes Projekt in Zusammenarbeit mit dem Muskellabor der Klinik für Neurologie und dem Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg initiiert. Zuvor war es jedoch notwendig, dass eine Machbarkeitsprüfung am Modelltumor der Ratte, dem R1H-Rhabdomyosarkom, durchgeführt wurde. Ziel dieser Arbeit war es, die in der Neurologie für Muskelfasern erprobten Untersuchungstechniken, wie die skinned fiber-Technik („enthäutete Faser“-Technik) und die Messung der Atmungskettenkomplexe am Oxygraphen mittels der hochauflösenden Respirometrie und der multiplen Substrat-Inhibitor-Technik, an Tumorgewebe der Ratte zu etablieren. Die Kennzeichnung von Unterschieden hinsichtlich der mitochondrialen Eigenschaften in Tumoren könnte ein weiterer Schritt im Verständnis von Änderungen des Tumormetabolismus im Gegensatz zum Normalgewebe bedeuten. Die könnte insbesondere bei schnell proliferierenden Tumoren, wie zum Beispiel Kopf-Hals-Tumoren, von Bedeutung sein.

#### **4.2 Übertragung respirometrischer Messmethoden auf R1H-Rhabdomyosarkome**

Mitochondriale Defekte wurden als Ursache schwerwiegender Erkrankungen, z.B. für mitochondriale Enzephalomyopathien, gefunden. Funktionale Defizite der Atmungskette sind bei diesen hereditären Muskelerkrankungen gut erforscht. Durch respirometrische Messungen der fünf Atmungskettenkomplexe lassen sich die Schädigungen und die daraus resultierenden Funktionseinschränkungen qualitativ und

quantitativ bestimmen (Sperl et al. 1997). Prinzipiell stehen zur Untersuchung des Bioenergiehaushaltes der Zellen mehrere Methoden zu Verfügung. Eine Methode, die die verschiedenen Möglichkeiten der Untersuchung des Sauerstoffmetabolismus der Zellen vereinigt (biochemische, volumetrische und manometrische Techniken), ist die hochauflösende Respirometrie (high- resolution- respirometry) mit Einsatz von polarographischen Sauerstoffsensoren (Clark- Elektroden) in Verbindung mit der multiplen Substrat-Inhibitor-Technik. Diese Methode erlaubt, kleinste Organismen, Gewebeprobe, Zellen oder gar isolierte Mitochondrien funktionell zu untersuchen. Sie ist mittlerweile in der Biochemie, Pathophysiologie und Neuromuskelphysiologie zur Funktionsanalyse von Mitochondrien vieler Gewebe, z.B. Hirn, Herzmuskulatur und vor allem quergestreifte Skelettmuskelzellen, fest etabliert.

Um funktionelle Eigenschaften von Mitochondrien zu untersuchen, werden in den meisten Laboratorien die Mitochondrien aus ihren Zellen isoliert und getrennt vom Zytosol untersucht. Gellerich et al. (1999), Veksler et al. (1987), Mazat et al. (1997) und Kunz et al. (1993) haben methodische Arbeiten zur Untersuchung der Mitochondrienfunktion in kleinsten humanen Probenmengen eingeführt (Sperl et al. 1997). So wurde die Technik der gehäuteten Muskelfasern, die skinned- fiber- Technik, wobei die Permeabilisation der Zellmembranen mittels Saponin erfolgt, zur Detektion von Funktionsdefiziten an Muskel- und Herzmitochondrien verschiedener Spezies, wie Mensch (Letellier et al. 1992, Sperl et al. 1997), Ratte (Veksler et al. 1987), Kaninchen (Gellerich et al. 2000, Trumbeckaite et al. 2003) und Maus (Braun et al. 2001) etabliert. Der Vorteil dieser Technik besteht insbesondere darin, dass über 90% der im Muskel vorhandenen Mitochondrien erfasst werden, was bei der Untersuchung heterogener Populationen wichtig ist (Larsson & Luft 1999). Ein weiterer Vorteil der skinned fiber- Technik liegt in der großen zeitlichen Stabilität der Mitochondrien während der Lagerung der Proben. Die Mitochondrienfunktion bleibt bei sachgemäßer Lagerung bis zu 20 Stunden erhalten, was den Versand von nativen Muskelproben oder anderen Geweben für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke erlaubt (Kuznetsov et al. 2003). Zu erwähnen ist außerdem die Möglichkeit, das Zusammenspiel zwischen Mitochondrien und anderen Zellorganellen, wie z.B. dem sarkoplasmatischen Retikulum, untersuchen zu können (Khuchua et al. 1994). Aufgrund des prinzipiell variablen Mitochondriengehaltes und den in der Muskulatur oder in anderen Geweben vorhandenen Inhomogenitäten, ist die Normierung

mitochondrialer Enzym- und Funktionsdaten auf die Citratsynthese erforderlich (Simonnet et al. 2002 und 2003).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Übertragbarkeit der skinned fiber- Technik auch auf andere Normalgewebe im Vergleich zum Skelettmuskel zu überprüfen. Es ist bekannt, dass sich mitochondriale Eigenschaften der gleichen Zellkulturen oder auch in Tumorzelllinien abhängig von den Kulturmedien und -zuständen unterscheiden können. Rossignol et al. (2004) fanden eine Verdopplung der endogenen Atmung bei HeLa- Zellen, sobald diese in Galaktose statt in Glukose kultiviert wurden. Die respirometrischen Untersuchungen unserer Gewebeproben hatten dagegen den Vorteil, dass reproduzierbare Resultate unabhängig von einem Kulturmedium und von Tumorwachstumsraten in Kultur erbracht werden konnten.

Für die Normalgewebe Rattenleber und -niere wurde gezeigt, dass sich diese Gewebe mechanisch mit Kanülen ohne Präparationsverluste zerkleinern ließen und eine Permeabilisation der Zellwände durch Saponin möglich war, ohne die Mitochondrien zu schädigen. Die Technik wurde ebenfalls für Zellkulturen angewendet (Ergebnis hier nicht dargestellt). Das Lebergewebe unterscheidet sich vom Nierengewebe durch einen wesentlich niedrigeren  $state3_{pyr}$ , wobei der  $state3_{suc}$  in der Niere deutlich erhöht war. Somit liegen für jedes Normalgewebe spezifische OXPHOS-Kapazitäten vor. Vergleichende Untersuchungen von Tumorgeweben müssen also immer das entsprechende Normalgewebe vor der malignen Transformation mit beinhalten. Nur so können spezifische Defekte in Tumoren auch richtig eingeordnet werden.

Die multiple Substrat-Inhibitor-Technik erlaubt es jeden Komplex der OXPHOS separat und mehrmals hintereinander in der oxygraphischen Messkammer zu untersuchen, was eine hohe Sicherheit der Messergebnisse gewährt. Die vorliegenden Daten der Arbeit zeigen, dass die multiple Substrat-Inhibitor-Technik in Normalgeweben sowie vor allem auch in Tumorgeweben zuverlässige Ergebnisse über die Funktion der OXPHOS erbringt. Sie erlaubt als Technik einen Vergleich der Atmungsaktivität des Komplexes I ( $state3_{pyr}$ ) und des Komplexes II ( $state3_{succ}$ ) in der gleichen Probe. Das Verhältnis der  $state3_{pyr}$  gegen die  $state3_{succ}$  (SRPR) ist ein unabhängiger Parameter und beträgt normalerweise circa 120% für den menschlichen Skelettmuskel und das menschliche Herz (Laterveer et al. 1996). Dieses Verhältnis

verringert sich bei Abnahme der Tätigkeit des Komplexes I, wie es bei einigen mitochondrial bedingten Erkrankungen und während des Alterns der Fall ist (Khuchua et al. 1994).

Der Komplex I der Atmungskette ist der größte und wahrscheinlich auch der stör anfälligste Enzymkomplex der Mitochondrien. Da sieben der 43 Untereinheiten mtDNA- kodiert sind, wurde u.a. im Muskellabor der MLU Halle-Wittenberg ein Versuchsansatz etabliert, der speziell für die Detektion Komplex I- abhängiger Funktionsverluste geeignet ist. Die Atmungsraten am Komplex I (Pyruvatatmung [state 3pyr]) und am Komplex II (Succinatatmung [state3succ]) der gleichen Muskelfasern und Tumoren wurden nacheinander nach Zugabe von Substraten und Hemmstoffen respirometrisch am Oxygraphen gemessen. Der Quotient aus beiden Messwerten (SRPR) ist unabhängig von der Mitochondrienmenge, aber abhängig von der relativen Ausstattung der Mitochondrien mit Komplex I, was sich ebenfalls gut mit dem Enzymaktivitäts- Quotienten von Komplex I+III/ II+III beschreiben lässt (Gellerich et al, submitted). Beide Messgrößen wurden an verschiedenen Muskeln verschiedener Spezies bestimmt und korrelieren signifikant miteinander. Beim Altern, bei Endotoxämie bei Sepsis im Pavianherzen, bei Ischämie und bei Deletionen der mtDNA nehmen beide Größen deutlich messbar ab (Gellerich et al. 2002a, Tostlebe et al. 2001, Trumbeckaite et al. 2001). Es standen uns also leistungsstarke Messmethoden zum Nachweis Komplex I-abhängiger Defekte aus dem Muskellabor auch für die Tumoranalyse zur Verfügung.

An den insgesamt 11 Experimentaltumoren konnten die Methoden zur Funktionsanalyse der OXPHOS ohne Probleme etabliert werden. Einzig auch das mechanische Aufbrechen der Zellwände war in den Tumoren einfacher und musste etwas vorsichtiger erfolgen. Es konnten jedoch bei allen Proben vitale Tumormitochondrien den Messungen zugeführt werden. Die Standardabweichungen der Messungen waren insgesamt gering. Durch die Mehrfachanalyse gelang es valide Tumordaten zu erheben.

### 4.3 Spezifische Atmungskomplex-Störungen in R1H-Rhabdomyosarkomen

Im R1H-Rhabdomyosarkom betrafen die gemessenen Veränderungen hauptsächlich den Komplex I der Atmungskette mit einer Absenkung der SRPR. Neben der starken Depression in den Komplexen I, konnte eine Zunahme der spezifischen Tätigkeiten der Komplexe II gezeigt werden. Diese nachgewiesenen Funktionsdefizite der Tumoren stehen in Übereinstimmung mit den Resultaten von Simonnet et al. (2002), die gleiches für Nierenzellkarzinome belegen konnten. Diese reduzierten Komplex I-Aktivitäten bei Tumoren wurden bereits auch in anderen Arbeiten beschrieben, die enzymatische und Proteinchemietechniken verwandten (Lichtor& Dohrmann 1986). Aber diese Studien konnten nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, die spezifischen Funktionsänderungen des Komplexes I erfassen. Durch die reduzierte state  $3_{\text{Pyr}}$  (Komplex I) konnte auch für das R1H- Rhabdomyosarkom eine geringere SRPR <100% bewiesen werden.

Wir führten gleichfalls in den R1H- Rhabdomyosarkomen auch vergleichende Messungen am Photospektrometer der intrazellulären Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe I bis IV und des Schrittmacherenzym des Zitratzyklus, der Citratsynthase, durch. Die Ergebnisse bestätigten bei den R1H-Rhabdomyosarkomen eine verminderte Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe I und III und der Citratsynthase im Vergleich zum gesunden Skelettmuskel. Zusätzlich wurde ein Abfall auch der COX nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den respirometrisch gemessenen Veränderungen an Komplex III und Komplex IV, wobei angegeben wird, dass ein verringertes Angebot an Cytochrom C und Cytochromoxygenase vorlag.

Die von PD Dr. rer nat. Gellerich zuvor durchgeführten Untersuchungen zeigten bereits, dass verminderte Atmungsraten in Skelettmuskeln alter Ratten im Vergleich zu jungen Ratten bestehen. Möglicherweise sind hier Alterungsprozesse, die eng an die Funktionstüchtigkeit der Atmungskettenkomplexe gebunden sind, entscheidend. Für die Untersuchungen der Atmungsraten in Tumoren und im Normalgewebe wurden nur gleichaltrige Tiere miteinander verglichen. Setzt man nun die Atmungsraten und die Enzymaktivitäten der R1H- Rhabdomyosarkome zu denen von Skelettmuskeln alter und zu junger Ratten, so stellt man eine lineare Abnahme der



Enzymaktivitäten und der Atmungsraten von jungen Ratten über die alten Tiere in Richtung Tumor fest. Dies spricht für altersabhängige Einflüsse auf die endogene Zellatmung. Die deutliche Atmungskettendefizienz im R1H- Rhabdomyosarkom ist sicherlich auf spezifische Komplexdefekte zurückzuführen und nicht nur auf eine verminderte Funktionsfähigkeit aufgrund von ROS-induzierten Schäden im Alterungsprozess. Somit können wohl für Tumoren gezieltere Störungsmechanismen der Atmungskettenkomplexe angenommen werden.

Für die R1H-Tumoren konnte zudem eine erhöhte Durchlässigkeit der mitochondrialen Innenmembranen demonstriert werden. Diese hohe Undichtigkeit konnte mit der Zunahme der Leakatmung erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dies mit Hilfe von Antimycin A, einem speziellen Blocker von Komplex III, geprüft. Schon Arcos et al. (1971) beschrieb bereits 1971 die möglichen strukturellen Atmungskettenänderungen mit einer Beschädigung der Komplexe als Ursache z.B. für die erhöhte Leakatmung in Tumorzellen.

#### **4.4 Rotenonhemmung in R1H- Rhabdomyosarkomen**

Ein Charakteristikum maligner Tumoren ist die Resistenz gegenüber Apoptosesignalen, die als verminderte Sterblichkeit seit langem beschrieben wird (Igney & Krammer 2002). Bekannt ist eine gesteigerte Apoptose in Normalzellen bei Defizienz im Komplex I und III unter anderem bei neurodegenerativen Erkrankungen (Leonard & Schapira 2000). Eine attraktive Hypothese für die Tumorentstehung wäre daher, die Unterdrückung der mitochondrialen Apoptosesignale durch funktionell defiziente Atmungskettenkomplexe zu postulieren.

Der Komplex I der Atmungskette gilt als empfindlichster Sensor für die O<sub>2</sub>-abhängige Einleitung von Apoptose oder Nekrose. Dies konnte unter anderem an akut hypoxisch geschädigten proximalen Tubuluszellen der Niere, die mit einer gesteigerten Apoptose auf diesen Stress reagierten. Nachweislich ist, dass die Komplex I-Defekt vor der Einleitung der Apoptose schützen kann (Barrientos & Moraes 1999). So gehen die im Komplex I-defizienten Zellen der Substantia nigra bei Morbus Parkinson trotz dieser Störung nicht in Apoptose. Wie andere Autoren, so konnte auch diese Arbeit die Komplex I-Defizienz als ein Charakteristikum von

Tumorzellen belegen (Penta et al. 2001). Vor allem die Erzeugung und Anhäufung von ROS sowie auch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg werden als zusätzliche Auslöser der mitochondrial getriggerten Apoptose angesehen (Wojtczak 1996). Nicht nur in Tumoren, aber dort besonders, sind die Komplex I und III die Majorstehungsorte für die ROS (Raha & Robinson 2001, Seo et al. 1998). So könnte postuliert werden, dass mit dem zunehmenden Defekt der Komplexe die Tumorzelle auch einen wichtigen Initiator der Apoptose ausschaltet und sich somit vor der Apoptose zu schützen versucht. Zudem haben Ahmed et al. (2005) gezeigt, dass auch hohe Glukosekonzentrationen in der Tumorzelle gegen diese Beschädigungen durch hohen oxidierenden Druck schützen kann, was dann als ein protektiver Mechanismus auch gegen die Apoptose gelten kann.

Prinzipiell können zwei verschiedene Ansätze, um den möglichen Zusammenhang von defekten Atmungskettenkomplexen und der Induzierbarkeit von Apoptose nachzuweisen, gewählt werden. Als erstes kann die Atmungskette gezielt durch implantierte mutierte Gene, die dann für defekte Komplexe kodieren, oder durch Zellen, die keine mtDNA mehr besitzen ( $p^0$ -Zellen), ausgeschaltet werden. Durch die gezielte Ausschaltung von Komplex I in Komplex I- mutierten und somit in atmungsdefizienten Zellen konnten Higuchi et al. (1998b) in Leukämiezellen die Apoptose verhindern. Erst durch die Aktivierung der Caspase 3 konnte die PT-Induktion realisiert werden und die Zellen gingen wieder in den Selbstmord (Higuchi et al. 1998a). Das gezielte Ausschalten von Komplex I stabilisierte die Außenmembran und führte so zu einer Verringerung der Apoptoseneigung. In  $p^0$ -Zellen konnte durch die Atmungskettenhemmer selbst keine Apoptoseinduktion eingeleitet werden.

Die zweite Möglichkeit ist die Atmungskette mittels ihrer speziellen Hemmstoffe zu blockieren und dann die Zellen auf ihre Apoptosewege hin zu untersuchen. Rotenon ist ein spezifischer Blocker der NADH-Dehydrogenase-Tätigkeit in der mitochondrialen Elektronentransportkette an Komplex I, aber hemmt den Fluss der Elektronen nicht von Komplex II zu Komplex III. Rotenon bindet an die Untereinheit im Komplex I, die vom ND1- Gen der mtDNA mit kodiert wird (Earley et al. 1987). Die Funktion der ND1- Untereinheiten wurde an charakteristischen Rotenon-resistenten Mutanten humaner Zelllinien, die zusätzlich zu nukleären Mutationen in

diesen mtDNA- Genabschnitten mutiert waren, untersucht (Hofhaus et al. 1995). Die Komplex I- Inhibitoren Rotenon und Antimycin A und der hocheffektive spezifisch mitochondriale ATPase- Inhibitor Oligomycin sind in der Lage, in lymphoblastoiden Zellen in 12 bis 18 Stunden Apoptose zu induzieren (Isenberg & Klaunig 2000). Dabei wurden z.B. Konzentrationen für Rotenon von 0.5 –5  $\mu$ M für die Auslösung des Selbstmordes ermittelt. Keine Induktion gelang in Zellen mit einer defekten Atmungskette. Zudem wurde diese Apoptose nicht durch die Anwesenheit von Bcl-2 gehemmt, was einen möglichen anderen Weg der Apoptoseinduktion durch diese Substanzen vermuten lässt (Wolvetang et al. 1994). In diesem Zusammenhang konnte auch ein Einfluss von Rotenon direkt auf die mitochondrial transitions Pore (MTP) und dann die Auslösung von Apoptose belegt werden (Chauvin et al. 2001). Zudem ließ sich eine absinkende Rotenonsensitivität bei alternden Zellen als besonders charakteristisches Zeichen nachweisen (Genova et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, auf enzymatischem- und auf Funktionsniveau eine spezifische Verminderung der Rotenonsensitivität durch die erhöhte Rotenon-Insensitivität am Komplex I in den Tumoren nachzuweisen. Möglicherweise lag es an einer verminderten Bindungsfähigkeit von Rotenon an Komplex I im R1H-Rhabdomyosarkom im Gegensatz zu den normalen Muskelgeweben. So könnte zum einen durch Mutationen der mtDNA in dieser Untereinheit von Komplex I, die spezifische Bindung des Rotenons an der ND1-Untereinheit, vermindert oder aufgehoben sein. Hofhaus et al. (1995) war es andererseits möglich auch nukleäre DNA-Mutation dafür verantwortlich zu machen. Aber auch der massive Defekt des Elektronenflusses im Komplex I selber könnte die Ursache für die wenig effektive Blockierung sein. Zukünftig müssen weitere Untersuchungen folgen, um diesen Mechanismus aufklären zu können.

#### **4.5 Einfluss des Tumormikromilieus auf die respiratorische Kapazität**

Nachweislich ist der intratumorale Blutfluss sehr heterogen. Das Gefäßnetzwerk eines Tumors ist als chaotisch zu bezeichnen. Daraus resultiert ein sehr unterschiedliches biologisches Wachstumsverhalten. Vielfältige Untersuchungen bestätigen, dass die Tumorgröße allein nicht mit der Gefäßdichte, intratumoraler Nekrosezonen und dem Ausmaß an Hypoxie korreliert (Gillies et al. 1999, Dunst et

al. 2001). Die Hypoxie begünstigt eine Malignisierung von Tumorzellen durch Selektion apoptosegehemmter, therapieresistenter Zellen (Vaupel et al. 2001). Zusätzlich löst sie eine Induktion spezifischer Proteine aus, die Teil vieler schon bekannter Wege, wie z.B. der Apoptose, des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung sind. Der genaue Ablauf der Induktion ist bisher noch verborgen. Diese Proteine werden als „Hypoxische Stress- Proteine“ bezeichnet. Identifiziert werden konnten bisher glukoseregulierende Proteine, glykolytische Enzyme, Proteine zur oxidativen Stressantwort, Proteine der Redoxhomöostase, einige Transkriptionsfaktoren, einige Proto- Onko- und Suppressor- Gene und Gene der Signaltransduktion (Sutherland et al. 1996). Weiter werden Proteine für die Angiogenese (VEGF) und zur Anämiekorrektur (EPO) induziert (Raleigh et al. 1998). Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt und auch allgemein als gesichert gilt, ist, dass Tumorzellen im Bereich der endogenen Komplexatmung defekt sind. Ob diese Atmungsdefekte qualitativ unterschiedlich innerhalb von Tumoren auftreten, oder ob diese homogen im gesamten Tumor vorkommen, wurde bisher nicht untersucht. Möglicherweise spielen diese als Mikromilieufaktoren bezeichneten Einflüsse eine Rolle in der Veränderung der Atmungsaktivität von Tumorzellen.

So wurden respirometrische Messungen in verschiedenen Tumorebenen des R1H-Rhabdomyosarkoms durchgeführt. Ob im Tumorrandbereich oder im -zentrum, die respirometrischen Parameter der Tumormitochondrien zeigten in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation nur leichte, nicht signifikante funktionelle Unterschiede, was der theoretischen Annahme von funktionellen Unterschieden bei morphologischen Unterschieden im Tumor widersprach. Im Tumorrandbereich des R1H-Rhabdomyosarkoms, einem Tumor, der sich in dieser Zone durch eine starke Vaskularisation kennzeichnet, wurde nur eine leicht geringere  $3_{\text{pyr}}$  im Vergleich zum Zentrum gemessen, einer Zone, die ebenfalls charakteristisch für diesen Tumor als zentrale Nekrose vorliegt. Durch den Nachweis von reduzierten, aber sicher vorhanden Komplex I- Aktivitäten und einer für Tumorzellen als spezifisch anzusehenden  $\text{SRPR} < 100\%$  muss auch in diesen Zellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Nekrosen liegen, von der Anwesenheit vitaler Tumormitochondrien ausgegangen werden. So sind Nekrosezonen nicht als „harmlose“ stoffwechsellinaktive Areale mit abgestorbenen Zellen anzusehen, sondern als aktive Tumorbereiche, die Zellen mit gesteigerter Glykolyse und vermehrter Resistenz

gegenüber von Apoptosesignalen aufweisen und somit eine hohe prognostische Relevanz besitzen (Kuhnt et al. 2005).

## **5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung**

Seit der Arbeit von Otto Warburg ist das Wissen über die Atmung von Tumorzellen immens erweitert worden. Vielfältige Untersuchungen der mitochondrialen Medizin haben zu einem großen Detailwissen beigetragen.

Während der Tumorgenese kommt es häufig zum Ersatz der aeroben endogenen Atmung durch die zytosolische Glykolyse. Frühzeitig wurde dies mit einer möglichen Störung der OXPHOS- Funktion von Tumorzellen in Verbindung gebracht.

Die in der Neurologie etablierten Methoden zur Untersuchung von Muskelfasern, wie die skinned fiber-Präparationstechnik und die multiple Substrat-Inhibitor-Titration, sind Methoden, die sich auch auf die respirometrische Untersuchung von anderen somatischen Körperzellen übertragen lassen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an einem Experimentaltumor der Ratte, dem in der Strahlenbiologie etablierten R1H-Rhabdomyosarkom, diese Messmethoden der endogenen Zellatmung ebenfalls einzuführen und auf ihre Robustheit zu überprüfen. Um die Leistungsfähigkeit dieser Methoden auch am Tumor zu belegen, wurden vergleichende Messungen an den Skelettmuskeln der Ratten durchgeführt. Hier lagen bereits umfangreiche Daten der Respirometrie und Photospektrometrie im Muskellabor der Neurologie der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg vor.

An insgesamt 11 Experimentaltumoren konnten die Methoden ohne Probleme überführt werden. Einzig das mechanische Aufbrechen der Zellwände war in den Tumoren einfacher und musste etwas vorsichtiger erfolgen. Es konnten jedoch bei allen Proben vitale Tumormitochondrien den Messungen zugeführt werden. Die Standardabweichungen der Messungen waren insgesamt gering. Durch die Mehrfachanalyse gelang es valide Tumordaten zu erheben.

Mittels respirometrischer Untersuchungen von Atmungsraten, Flusskoeffizienten und photospektrometrischer Enzymaktivitäten konnten zudem spezifische Veränderungen im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe, welches durch das Skelettmuskelgewebe desselben Tieres repräsentiert wurde, aufgezeigt werden, wobei die fast komplette Funktionsstörung von Komplex I der OXPHOS in den R1H-

Tumoren mit Sicherheit das eindrucksvollste Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist.

Perspektivisch könnten zukünftig Untersuchungen anderer Tumorentitäten folgen sowie eine Aufgliederung der Veränderungen an der mitochondrialen OXPHOS während der Karzinogenese anhand von prämaligen Tumorstufen (Dysplasien). Dies wäre besonders für schnell proliferierende Tumoren, wie z.B. für Plattenepithelkarzinome im Kopf- Hals- Bereich interessant.

## **6 Literatur**

1. Ahmed IM, Aykin-Burns N, Sim JE, Walsh SA, Higashikubo R, Buettner GR, Venkataraman S, Mackey MA, Flanagan SW, Oberley LW, Spitz DR: Mitochondrial O<sub>2</sub><sup>\*</sup>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem* 280 (2005) 4254-4263
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (1981) 457-465
3. Arcos JC: Ultrastructural alteration of the mitochondrial electron transport chain involving electron leak: possible basis of "respiratory impairment" in certain tumors. *J Theor Biol* 30 (1971) 533-543
4. Baisch H, Collard J, Zywiets F, Jung H: No acquisition of metastatic capacity of R1H rhabdomyosarcoma upon transfection with c-Ha-ras oncogene. *Invasion Metastasis* 10 (1990) 193-207
5. Barrientos A & Moraes CT: Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem* 274 (1999) 16188-16197
6. Benda C: *Arch Physiol* 73 (1898) 393-398

7. Bergmeyer HU: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin, 1970
8. Bernardi P: Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol* 79 (1999) 1127–1155
9. Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL: Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 256 (1981) 8699-8704
10. Brammer I, Zywiets F, Beck-Bornholdt HP, Jung H: Kinetics of depopulation, repopulation and host cell infiltration in the rhabdomyosarcoma R1H after 14 MeV neutron irradiation. *Int J Radiat Biol* 61 (1992) 703-711
11. Braun U, Paju K, Eimre M, Seppet E, Orlova E, Kadaja L, Trumbeckaite S, Gellerich FN, Zierz S, Jockusch H, Seppet EK: Lack of dystrophin is associated with altered integration of the mitochondria and ATPases in slow-twitch muscle cells of MDX mice. *Biochim Biophys Acta* 1505 (2001) 258-270
12. Chance B & Hess B: Metabolic control mechanism. IV. The effect of glucose upon the steady state of respiratory enzymes in the ascites tumor cells. *J Biol Chem* 234 (1959) 2416-2420
13. Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E: Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition- induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* 276 (2001) 41394-41398
14. Chinnery PF & Turnbull DM: Mitochondrial DNA and disease. *Lancet* 354 (1999) 17-21
15. Chinnery PF & Turnbull DM: Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 106 (2001a) 94-101

16. Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Brown DT, Parsons TJ, Turnbull DM: Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains. *Am J Hum Genet* 68 (2001b) 529-532
17. Crabtree HG: Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J* 23 (1929) 536-545
18. Crumrine PK, Koenigsberger MR, Chutorian AM: Footdrop in the neonate with neurologic and electrophysiologic data. *J Pediatr* 86 (1975) 779-80
19. Cuezva J, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC: The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62 (2002) 6674-6681
20. Dahl HH & Thorburn DR: Mitochondrial diseases: beyond the magic circle. *Am J Med Genet* 106 (2001) 1-3
21. Deshpande SS, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K: Rac1 inhibits TNF- $\alpha$ -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J* 14 (2000) 1705-1714
22. DiMauro S: Ottorino Rossi Award 2001. Mitochondrial DNA: a genetic Pandora's box. *Funct Neurol* 16 (2001) 103-116
23. DiMauro S, Andreu AL, Musumeci O, Bonilla E: Diseases of oxidative phosphorylation due to mtDNA mutations. *Semin Neurol* 21 (2001) 251-260
24. DiMauro S & Schon EA: Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 106 (2001) 18-26
25. Dunst J, Stadler P, Becker A, Kuhnt T, Lautenschlager C, Molls M, Haensgen G. Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers. *Strahlenther Onkol* 177 (2001) 469-473



26. Earley FG, Patel SD, Ragan I, Attardi G: Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [3H]dihydrorotenone. FEBS Lett 219 (1987) 108-112
27. Eble JN & Hull MT: Morphologic features of renal oncocytoma: a light and electron microscopic study. Hum Pathol 15 (1984) 1054-1061
28. Ebner D, Rodel G, Pavenstaedt I, Haferkamp O: Functional and molecular analysis of mitochondria in thyroid oncocytoma. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 60 (1991) 139-144
29. Eichler W & Schertel B: Dihydroorotate induces Ca<sup>2+</sup> release from rat liver mitochondria: a contribution to the mechanism of alloxan-induced Ca<sup>2+</sup> release. Biol Chem Hoppe Seyler 369 (1988) 1287-1293
30. Engel WK, Cunningham GC: Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh- frozen biopsy sections. Neurol 13 (1963) 919
31. Estornell E, Fato R, Pallotti F, Lenaz G: Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase. FEBS Lett 332 (1993) 127-131
32. Evtodienko YuV, Teplova VV, Duszynski J, Bogucka K, Wojtczak L: The role of cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>] in glucose-induced inhibition of respiration and oxidative phosphorylation in Ehrlich ascites tumourcells: a novel mechanism of the Crabtree effect. Cell Calcium 15 (1994) 439-446
33. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, Zierz S, Muller-Werdan U, Werdan K, Redl H, Schlag G: Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. Shock 11 (1999) 336-341
34. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Seppet E, Rasmussen HN, Neuhoff C, Zierz S: Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and disease. Biochem. Soc Trans 28 (2000) 164-169

35. Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Muller T, Neudecker S, Zierz S: Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Acta* 1556 (2002a) 41-52
36. Gellerich F.N, Trumbeckaite S. Müller T, Chen Y, Deschauer M, Gizatullina Z, and Zierz S: Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Biochem* 265/257 (2003) 379-386
37. Genova ML, Bovina C, Marchetti M, Pallotti F, Tietz C, Biagini G, Pugnali A, Viticchi C, Gorini A, Villa RF, Lenaz G: Decrease of rotenone inhibition is a sensitive parameter of complex I damage in brain non-synaptic mitochondria of aged rats. *FEBS Lett* 410 (1997) 467-469
38. Gillies RJ, Schornack PA, Secomb TW, Raghunand N. Causes and effects of heterogeneous perfusion in tumors. *Neoplasia* 1 (1999) 197-207
39. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC: A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 16 (1997) 226-234
40. Green DR & Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 (1998) 1309-1312
41. Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K: Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28 (2000) 285-296
42. Guppy M, Greiner E, Brand K: The Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem* 212 (1993) 95-9

43. Haller T, Ortner M, Gnaiger E: A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Anal Biochem* 218 (1994) 338-342
44. Hatefi Y: Preparation and properties of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I), EC 1.6.5.3., *Methods Enzymol* 53 (1978) 11-14
45. Higuchi M, Honda T, Proske RJ, Yeh ET: Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene* 17 (1998a) 2753-2760
46. Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET: Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 17 (1998b) 2515-2524
47. Hofhaus G, Attardi G: Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 964-974
48. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331 (1988) 717-719
49. Ibsen KH, Coe EL, Mc Kee RW: Some factors influencing respiration and glycolysis. *Cancer Res* 20 (1960) 1399-1407
50. Igney FH & Krammer PH: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 277-288
51. Isenberg JS & Klaunig JE: Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells. *Toxicol Sci* 53 (2000) 340-351

52. Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K: A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394 (1998) 694-697
53. Jennings RB, Herdson PB, Hill ML: Pyruvate metabolism in mitochondria isolated from dog myocardium. *Lab Invest* 20 (1969) 537-547
54. Jockel J, Wendt B, Loffler M: Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 56 (1998) 1053-1060
55. Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD: Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377 (1995) 438-441
56. Jung H, Beck HP, Brammer I, Zywiets F: Factors contributing to tumour growth after irradiation. *Br J Cancer* 41 (1980) 226-229
57. Jung H, Beck HP, Brammer I, Zywiets F: Depopulation and repopulation of the R1H rhabdomyosarcoma of the rat after X-irradiation. *Eur J Cancer* 17 (1981) 375-386
58. Jung H, Kruger HJ, Brammer I, Zywiets F, Beck-Bornholdt HP: Cell population kinetics of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat after single doses of X-rays. *Int J Radiat Biol* 57 (1990) 567-589
59. Khuchua Z, Belikova Y, Kuznetsov AV, Gellerich FN, Schild L, Neumann HW, Kunz WS: Caffeine and Ca<sup>2+</sup> stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human skeletal muscle fibers due to activation of actomyosin ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1188 (1994) 373-379

60. Kim MM, Clinger JD, Masayeva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH, Califano JA: Mitochondrial DNA Quantity Increases with Histopathologic Grade in Premalignant and Malignant Head and Neck Lesions. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 8512-8515
61. Koobs DH: Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science* 178 (1972) 313-316
62. Kraehenbuhl S, Talos C, Wiesmann U, Hoppel CL: Development and evaluation of a spectrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rats and humans. *Clin Chim Acta* 230 (1994) 177-187
63. Kuhnt T, Mueller AC, Pelz T, Hänsgen G, Bloching M, Koesling S, Schubert J, Dunst J: Impact of tumor control and presence of visible necrosis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy or radiochemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 131 (2005) 758-764
64. Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, Eichhorn K, Schild L, Striggow F, Bohnensack R, Neuhof S, Grasshoff H, Neumann HW: Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim Biophys Acta* 1144 (1993) 46-53
65. Kuznetsov AV, Kunz WS, Saks V, Usson Y, Mazat JP, Letellier T, Gellerich FN, Margreiter R: Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. *Anal Biochem* 319 (2003) 296-303
66. Larsson NG & Luft R: Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Lett* 455 (1999) 199-202
67. Laterveer FD, Nicolay K, Gellerich FN: ADP delivery from adenylate kinase in the mitochondrial intermembrane space to oxidative phosphorylation increases in the presence of macromolecules. *FEBS Lett* 386 (1996) 255-259

68. Lee HC & Wei YH: Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005) 822-834
69. Leese HJ & Bronk JR: Lactate formation by rat small intestine in vitro. *Biochim Biophys Acta* 404 (1975) 40-48
70. Leonard JV & Schapira AH: Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* 355 (2000) 389-394
71. Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP: Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr Res* 32 (1992) 17-22
72. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP: Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *J Biol Chem* 278 (2003) 8516-8525
73. Lichtor T & Dohrmann GJ: Respiratory patterns in human brain tumors. *Neurosurgery* 19 (1986) 896-899
74. Löffler M, Jockel J, Schuster G, Becker C: Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem* 174 (1997) 125-129
75. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernester L, Afzelius B: A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: A correlated clinical, biochemical and morphology study. *J Clin Invest* 41 (1962) 1776- 1804

76. Luft R: The development of mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta* 1271 (1995) 1-6
77. Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL: Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 272 (1997a) 22776-22780
78. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL: Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr* 29 (1997b) 339-343
79. Maximo V, Sobrinho-Simoes M: Hurthle cell tumors of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch* 437 (2000) 107-115
80. Mazat JP, Letellier T, Bedes F, Malgat M, Korzeniewski B, Jouaville LS, Morkuniene R: Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies. *Mol. Cell Biochem* 174 (1997) 143-148
81. Meulemans A, Lissens W, Coster RV, Meirleir LD, Smet J, Nassogne MC, Liebaers I, Seneca S: Analysis of the mitochondrial encoded subunits of complex I in 20 patients with a complex I deficiency. *Eur. J. Paediatr. Neurol* 8 (2004) 299-306
82. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database: (2005) <http://www.mitomap.org>
83. Nouette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, Sztark F: Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res* 66 (2005) 132-140

84. Packer L & Golder RH: Correlation of structural and metabolic changes accompanying the addition of carbohydrates to Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem* 235 (1960) 1234-1240
85. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH: Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 1555 (2002) 14-20
86. Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M: Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol* 182 (2000) 339-350
87. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC: Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 488 (2001) 119-133
88. Pfanner N & Meijer M: The Tom and Tim machine. *Curr Biol* 7 (1997) 100-103
89. Raha S & Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 106 (2001) 62-70
90. Raleigh JA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Ballenger CA, Weissler MC, Fowler WC Jr, Novotny DB, Varia MA. Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res* 58 (1998) 3765-3768
91. Reitzer LJ , Wice BM, Kenell D: Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254 (1979) 2669-2676
92. Ricquier D, Bouillaud F: Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance *The Journal of Physiology* 529 (2000) 3-10



93. Rieske JS, Baum H, Stoner CD, Lipton SH: On the antimycin-sensitive cleavage of complex 3 of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 242 (1967) 4854-4866
94. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA: Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64 (2004) 985-993
95. Schapira AHV: Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochem Biophys Acta* 1366 (1998) 225-233
96. Seo BB, Kitajima-Ihara T, Chan EK, Scheffler IE, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 9167-9171
97. Seshagiri PB & Bavister BD: Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: Evidence for the „Crabtree effect“. *Mol Reprod Develop* 30 (1991) 105–111
98. Shepherd D & Garland PB: The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J* 114 (1969) 597-610
99. Shoubridge EA: Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 106 (2001a) 46-52
100. Shoubridge EA: Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet* 10 (2001b) 2277-2284

101. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C: The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 13207-13212
102. Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont J, Bouvier R, Schagger H, Godinot C: Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 23 (2002) 759-768
103. Simonnet H, Demont J, Pfeiffer K, Guenaneche L, Bouvier R, Brandt U, Schagger H, Godinot C: Mitochondrial complex I is deficient in renal oncocytomas. *Carcinogenesis* 24 (2003) 1461-1466
104. Smeitink JA, Loeffen JL, Triepels RH, Smeets RJ, Trijbels JM, van den Heuvel LP: Nuclear genes of human complex I of the mitochondrial electron transport chain: state of the art. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 1573-1579
105. Smith PK & Krohn RI: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1994) 76-85
106. Sperl W, Skladal D, Gnaiger E, Wyss M, Mayr U, Hager J, Gellerich FN: High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Mol Cell Biochem* 174 (1997) 71-78
107. Suomalainen A, Majander A, Wallin M, Setala K, Kontula K, Leinonen H, Salmi T, Paetau Haltia M, Valanne L: Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. *Neurology* 48 (1997) 1244-1253
108. Sutherland RM, Ausserer WA, Murphy BJ, Laderoute KR. Tumor Hypoxia and Heterogeneity: Challenges and Opportunities for the Future. *Semin Radiat Oncol* 6 (1996) 59-70

109. Teplova VV, Bogucka K, Czyz A, Evtodienko Yu V, Duszynski J, Wojtczak L: Effect of glucose and deoxyglucose on cytoplasmatic [Ca<sup>2+</sup>] in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Biophys Res* 196 (1993) 1148-1154
110. Tisdal HD: Preparation and properties of succinic cytochrome c reductase (Complex II- III). *Methods Enzymol* 10 (1967) 213-215
111. Tostlebe M, Chen Y, Müller S, Gellerich FN: Altersabhängige Verminderung der relativen Pyruvatatmung im M. soleus und im linksventrikulären Myokard von FISHER- Ratten durch Aktivitätsabnahme von Komplex I der Atmungskette. *Nervenheilkunde* 7 (2001) 43
112. Trumbeckaite S, Opalka JR, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN: Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. *Eur J Biochem* 268 (2001) 1422-1429
113. Trumbeckaite S, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN: Calpain Inhibitor (BSF 409425) Diminishes Ischemia-Reperfusion- Induced Damage of Rabbit Heart Mitochondria. *Biochem Pharmacol* 65 (2003) 911-916
114. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28 (2001) 29-35
115. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA: Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 892 (1987) 191-196
116. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242 (1988) 427-430
117. Warburg O: On the origin of cancer cells. *Science* 123 (1956) 309-314

118. Warburg O, Geissler AW, Lorenz S: Measurement of oxygen pressure during the conversion of embryonic metabolism into Krebs cycle metabolism. *Z Naturforsch B* 20 (1965) 1070-1073
119. Warburg O: Über die letzte Ursache und die entfernten Ursachen des Krebses. Verlag Konrad Triltsch, Vortrag bei der Tagung der Nobelpreisträger in Lindau / Bodensee, 1966
120. Werneck LC, Di Mauro S. Muscle carnitine deficiency: report of 8 cases with clinical, electromyographic, histochemical and biochemical studies. *Arq Neuropsiquiatr* 43 (1985) 281-295.
121. Wharton DC & Tzagoloff A: Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol* 10 (1967) 245-250
122. Wolvetang EJ, Johnson KL, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW: Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett* 339 (1994) 40-44
123. Wojtczak L: The Crabtree effect: a new look at the old problem. *Acta Biochim Pol* 43 (1996) 361-368
124. Wussling MH, Krannich K, Landgraf G, Herrmann-Frank A, Wiedenmann D, Gellerich FN, Podhaisky H: Sarcoplasmic reticulum vesicles embedded in agarose gel exhibit propagating calcium waves. *FEBS Lett* 463 (1999) 103-109
125. Zullo SJ, Cerritos A, Merrill CR: Possible relationship between conditions associated with chronic hypoxia and brain mitochondrial DNA deletions; reduction of genomic 8-hydroxyguanine levels in human brain tissues containing elevated levels of the human mitochondrial DNA4977 deletion. *Arch Biochem Biophys* 367 (1999) 140-142

## 7 Thesen

1. In Abhängigkeit von der Zellart nehmen Mitochondrien 3% bis 25% des Zellvolumens ein. Mitochondrien können in ihrer Größe mit einem mittleren Durchmesser von 0,5-1µm und mit einer mittleren Länge von etwa 1 bis 5µm und in ihrer Form variieren. Sie besitzen jedoch alle die gleiche grundlegende Struktur.
2. Die metabolische Aktivität einer Zelle hängt von der Anzahl der Mitochondrien und der Ausprägung der Cristae ab. Zellen mit großer metabolischer Aktivität, wie z.B. Herzmuskelzellen, haben viele und gut entwickelte Mitochondrien. Mitochondrien setzen sich aus mehr als 800 unterschiedlichen Proteinen zusammen, von denen lediglich 13 Proteine im Mitochondrium selbst synthetisiert werden. Alle diese 13 Proteine sind Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette, der OXPHOS.
3. Die Innenmembran enthält fünf Proteinkomplexe, die so genannten integralen Membranproteine. Vier von ihnen bilden die Atmungskette (OXPHOS): Komplex I, II und III beliefern die Cytochrom c- Oxidase (COX) mit Elektronen für die Reduktion des Sauerstoffs.
4. Die originäre Aufgabe der Mitochondrien besteht in der ATP- Produktion zur Energiebereitstellung für die verschiedenen StoffwechsellLeistungen. Des Weiteren werden Aminosäuren, Fettsäuren, Steroide und Harnstoff in den Mitochondrien metabolisiert. Seit einiger Zeit sind spezielle Funktionen in der  $Ca^{2+}$  - Regulation sowie in der Biosynthese der Orotsäure bekannt geworden. Die Mitochondrieninnenmembran, speziell die fünf Atmungskettenkomplexe, stehen im Mittelpunkt von Zellalterungsprozessen. Mitochondrien besitzen eine Schlüsselrolle als Sensor und Auslöser in den Pathways der Apoptose und Nekrose.
5. Otto Warburg gelang es erstmals, die Beteiligung der Mitochondrien an der Pathogenese maligner Tumoren aufgrund deren Neigung zur vermehrten

aeroben Glykolyse nachzuweisen. Daher ist die Tumorphiliferation von der Anwesenheit von Sauerstoff weitestgehend unabhängig.

6. In der überwiegenden Mehrzahl zeichnen sich Tumoren als ein Ort mit stark erhöhter Glukosespeicherung und erhöhtem Glukoseumsatz aus, wodurch eine Hemmung der endogenen Atmung eintritt. Erstmals wurde dieses Phänomen von Herbert G. Crabtree (1929) beschrieben und nach ihm „Crabtree effect“ benannt. Die Daten der Literatur zeigen unterschiedliche Forschungsergebnisse hinsichtlich einer spezifischen Störung der Atmungskettenkomplexe in Tumoren.
7. Die in der Neurologie und Pathophysiologie für Muskelfasern erprobten Methoden, wie die skinned fiber-Technik (enthäutete Faser- Technik) und die oxygraphische Messung der Atmungskettenkomplexe mittels hochauflösender Respirometrie und multipler Substrat- Inhibitor- Technik standen zur Verfügung, wurden aber bisher nicht an Tumorgewebe auf ihre Durchführbarkeit überprüft.
8. Die vorliegenden Daten der Arbeit zeigen, dass die multiple Substrat-Inhibitor-Technik in Normalgewebe sowie vor allem auch in Tumorgewebe zuverlässige Ergebnisse über die Funktion der OXPHOS erbringt. Im R1H-Rhabdomyosarkom ist die Atmung am Komplex I (state 3<sub>pyr</sub>) im Vergleich zum Skelettmuskel vermindert. Neben der starken Depression im Komplex I kann eine Zunahme der spezifischen Tätigkeiten im Komplex II gezeigt werden. Bei einer massiven Absenkung der SRPR muss von einem funktionellen Defekt des Komplexes I ausgegangen werden.
9. Die Atmung am Komplex I (state 3<sub>pyr</sub>) kann durch Rotenon gehemmt werden. Diese Hemmung ist beim Skelettmuskel charakteristisch sehr stark ausgeprägt. Im R1H-Rhabdomyosarkom liegt eine verminderte Hemmbarkeit des Komplexes I vor, was sichtbar in einer Erhöhung der Rotenon-insensitiven Atmung ist.

10. Bekannt ist, dass Alterungsprozesse eng an die Funktionstüchtigkeit der Atmungskettenkomplexe gebunden sind. Es liegen vor allem durch ROS-induzierte Schädigungen verminderte Atmungsraten in Skelettmuskeln alter Ratten im Vergleich zu jungen Ratten vor. Die massive Atmungskettendefizienz im R1H- Rhabdomyosarkom, die deutlich unter der von alternden Muskeln liegt, ist möglicherweise auf stärker funktionell gestörte Komplexe zurückzuführen.
11. Nachweislich ist der intratumorale Blutfluss sehr heterogen. Das Gefäßnetzwerk eines Tumors ist als chaotisch zu bezeichnen. Daraus resultiert ein sehr unterschiedliches biologisches Wachstumsverhalten. Hypoxie begünstigt eine Malignisierung von Tumorzellen durch Selektion apoptosegehemmter, therapieresistenter Zellen.
12. Es wurden respirometrische Messungen in verschiedenen Tumorarealen des R1H-Rhabdomyosarkoms durchgeführt. Im Tumorrandbereich des R1H-Rhabdomyosarkoms, einem Tumor, der sich in dieser Zone durch eine starke Vaskularisation kennzeichnet, wurde nur eine leicht geringere  $\text{state } 3_{\text{pyr}}$  im Vergleich zum Zentrum gemessen, einer Zone, die ebenfalls charakteristisch für diesen Tumor als zentrale Nekrose vorliegt. Durch den Nachweis von reduzierten, aber sicher vorhandenen Komplex I- Aktivitäten und einer für Tumorzellen als spezifisch anzusehenden  $\text{SRPR} < 100\%$  muss auch in diesen Zellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Nekrosen liegen, von der Anwesenheit vitaler Tumormitochondrien ausgegangen werden. So sind Nekrosezonen nicht als „harmlose“ stoffwechsellinaktive Areale mit abgestorbenen Zellen anzusehen, sondern als aktive Tumorbereiche, die Zellen mit gesteigerter Glykolyse und vermehrter Resistenz gegenüber von Apoptosesignalen aufweisen und somit eine hohe prognostische Relevanz besitzen.

## **8 Erklärungen**

### **Erklärung über das Vorliegen eines Ethikvotums**

Für die Tierversuche lag im Rahmen eines Forschungsvorhabens genehmigt durch das Land Sachsen- Anhalt ein Ethikvotum der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg vor.

### **Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar und mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Weder im In- noch im Ausland wurde eine Promotion von mir eingereicht bzw. ein Promotionsverfahren eröffnet.

Halle, den 10.12.2007

.....

Tanja Pelz



## 9 Lebenslauf

Name:	Pelz
Vorname:	Tanja
Geburtsdatum:	22.04.1975
Geburtsort:	Halle/ Saale
Wohnort:	Kurt- Eisner- Str. 18 06110 Halle/ Saale
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Vater:	Roland Pelz Diplom-Ingenieur (FH) für Kälte- und Klimatechnik
Mutter:	Sabine Pelz Ingenieur für Kälte- und Klimatechnik
Schulbildung	
1981 - 1990	POS Kanena- Bruckdorf
1990 - 1993	Thomas- Müntzer- Gymnasium Halle/ Saale
1993	Abitur
Berufsbildung	
1993 -1995	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg; Ärztliche Vorprüfung
1995 – 1999	Klinisches Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1996 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1999
1999 - 2000	Praktisches Jahr 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 2000	Facharztweiterbildung in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie an der Martin- Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, den 10.12.2007

.....  
Tanja Pelz

## **10 Danksagung**

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. J. Dunst für die Überlassung des Promotionsthemas sowie der kommissarischen Klinikleiterin Frau PD Dr. med. G. Hänsgen für die engagierte Weiterbetreuung der Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. S. Zierz für die Möglichkeit, die Untersuchungen im Muskellabor seiner Klinik durchführen zu dürfen. Herrn PD Dr. rer. nat. F.N. Gellerich danke ich für die Hilfestellung bei der Etablierung der neurologisch erprobten Methoden am Tumor- und Normalgewebe der Ratten.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Th. Kuhnt, der mich bei allen aufgetretenen Problemen jederzeit mit viel Geduld beraten hat, für die zuverlässige Betreuung der Arbeit.

Zusätzlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung.

## 11 Publikationen

Kuhnt T, **Pelz T**, Qu X, Hansgen G, Dunst J, Gellerich FN.

Mitochondrial OXPHOS functions in R1H rhabdomyosarcoma and skeletal muscles of the rat. *Neurochem Res* 32 (2007) 973-980

**Pelz T**, Kuhnt T, Gellerich FN, Hänsgen G, Zywietz F, Becker A, Dunst J.

Oxygraphische Messungen der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe an Proben des implantierten R1-H Rhabdomyosarkoms der Ratte. *Molecular Radiation Biology Oncology* 2 (2001) 74

Kuhnt T, **Pelz T**, Hänsgen G, Becker A, Dunst J, Gellerich FN.

Respirometrische Untersuchungen der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe an Tumorproben von Patienten mit HNO- Tumoren. *Strahlenther Onkol* 177 (2001) 31

Kuhnt T, **Pelz T**, Xiaoying Q, Spohn V, Hänsgen G, Bloching M, Becker A, Zywietz F, Dunst J, Zierz S, Gellerich FN.

Complex I-caused dysfunction in mitochondria of human tumors and rat rhabdomyosarcoma. *Biochimica et Biophysica Acta* 1657 (2004) 54

Gellerich FN, Chen Y, Gizatullina Z, Seppert E, Trumbeckaite S, Deschauer M, Wussling M, Holtz J, Kuhnt T, **Pelz T**, Dunst J, Zierz S.

Complex I deficiency a central mechanism for energetic depression at mitochondrial disorders, aging, sepsis, cancerogenesis and intoxications. *Biochimica et Biophysica Acta* 1657 (2004) 86