

Aus der Neurologischen Universitätsklinik der
Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. S. Zierz

**Analyse der Genotyp- Phänotyp-Beziehungen von
Mitochondrien in Muskelbiopsien und in Cybrids mit
„single deletions“ mittels Metabolischer Kontrollanalyse**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Ying Chen

geboren am 3. Februar 1961 in Nantong

Betreuer: Priv. Doz. Dr. F.N. Gellerich

Gutachter: PD Dr. F. N. Gellerich

Prof. Dr. med. J. Holtz

Prof. Dr. W.S. Kunz (Bonn)

urn:nbn:de:gbv:3-000008952

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008952>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es qualitative und quantitative Genotyp-Phänotyp Beziehungen an Biopsien und Cybrids mit „common deletion“ zu ermitteln. So sollte mit enzymatischen und funktionellen Techniken untersucht werden, ob unterschiedliche Deletionen gleiche oder verschiedene mitochondriale Störungen verursachen. Weiterhin sollten mittels Flusskontrollanalyse die Auswirkungen der durch Deletionen verminderten Atmungskettenkomplexe auf die Mitochondrienfunktion quantifiziert werden.

In der Skelettmuskulatur von CPEO-Patienten mit „common deletion“ nahm mit steigender Heteroplasmie die Menge der Mitochondrien zu. Parallel dazu nahmen sowohl die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I, I+III, II+III, III und der Cytochromoxidase (COX) als auch die maximalen Atmungsraten linear ab. Diese linearen Abnahmen waren unabhängig von der Deletionsgröße. Anhand von drei Patienten mit gleichen Heteroplasmiegraden aber stark unterschiedlicher Deletionsgröße, konnte gezeigt werden, dass die Deletion der tRNA-Gene von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung ist, und dass die Deletion von Proteingenen keine zusätzliche Schädigung verursacht.

In „skinned fibres“ von Patienten ohne Muskelerkrankungen war der Flusskontrollkoeffizient der Cytochromoxidase ($Co_{COX} = 0,23 \pm 0,07$) doppelt so hoch, wie für Komplex I ($Co_{Komplex I} = 0,11 \pm 0,02$). Damit in Übereinstimmung wurde gefunden, dass die state 3 Atmung linear mit der COX Aktivität korreliert und dass es demnach keine überschüssige COX-Aktivität zu geben scheint. In CPEO-Patienten stieg die Kontrolle beider Enzymer deutlich an ($Co_{Komplex I} = 0,33$; $Co_{COX} = 0,31$).

Mit Hilfe von experimentell ermittelten, scheinbaren Dissoziationskonstanten konnte erstmals die Flusskontrolle der COX auf die Zellatmung intakter humaner Zellen (also bezüglich der Mitochondrien unter IN VIVO-Bedingungen) bestimmt werden (Myoblasten, $Co_{COX} = 0,32$; Glatte Gefäßmuskelzellen, $Co_{COX} = 0,25$), die höher ist als in isolierten Mitochondrien gesunder Patienten. Bei Entkopplung und nach Glukosezusatz stiegen die Flusskontrollkoeffizienten der COX an. In Cybrids mit der „common deletion“ war die Kontrolle der COX ($Co_{COX} = 0,59$) gegenüber dem Wildtyp ($Co_{COX} = 0,31$) deutlich erhöht. Es ist demnach mittels Flusskontrollanalyse möglich, mutationsbedingte Verminderungen der Mitochondrienfunktion in intakten Zellkulturen zu quantifizieren.

Chen, Ying: Analyse der Genotyp- Phänotyp-Beziehungen von Mitochondrien in Muskelbiopsien und in Cybrids mit „single deletions“ mittels Metabolischer Kontrollanalyse. Halle, Martin-Luther-Universität, Medizinische Fakultät. Dissertation, 58 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Mitochondrien: domestizierte Bakterien mit enormer Komplexität	7
1.2	Genotyp - Phänotyp Beziehungen bei mitochondrialen Erkrankungen	7
1.3	Akute Störungen der Mitochondrienfunktion	8
1.4	Energetische Depression des Zellstoffwechsels	9
1.5	Schwellenwerte mitochondrialer Funktionsstörungen	10
1.6	Metabolische Kontrolltheorie	11
1.7	Metabolische Kontrollanalyse, ein Werkzeug zur Untersuchung funktioneller Auswirkungen von Enzymdefekten	12
1.8	Experimentelle Bestimmung der Flußkontrolle von Atmungsketten komplexen	14
2	Zielstellung dieser Arbeit	17
3	Materialien und Methoden	18
3.1	Chemikalien und Hemmstoffe	18
3.2	Puffer , Medien und Medienzusätze	18
3.3	Untersuchungsgut	19
3.4	Geräte	19
3.5	Zellkultur	20
3.6	Aufarbeitung der Muskelproben	21
3.7	Oxygraphische Untersuchung der Mitochondrienfunktion in intakten Zellen	22
3.8	Bestimmung von Flusskontrollkoeffizienten	23
3.9	Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivitäten	23
3.9.1	Komplex I (NADH:Coenzym Q-Oxireduktase)	24
3.9.2	Komplex I+III (NADH:Cytochrom c-Oxidoreduktase)	24
3.9.3	Komplex II+III (Succinat:Cytochrom-c-Oxidoreduktase)	25
3.9.4	Komplex III (Ubichinol: Cytochrom-c-Oxidoreduktase)	25
3.9.5	Cytochrom –c-Oxidase (COX)	25
3.9.6	Citratsynthase (CS)	26
3.9.7	Succinat-Dehydrogenase (SDH)	27
3.10	Statistische Verfahren	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Veränderungen im Muskelmitochondrien von CPEO Patienten mit „single deletions“	28

4.1.1	Der Zusammenhang zwischen Atmungsraten und den Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe in der Skelettmuskulatur von CPEO-Patienten	28
4.1.2	Untersuchung der Flusskontrolle der Cytochromoxidase und von Komplex I	32
4.2	Die Flusskontrolle in intakten Muskelzellen	33
4.3	Einfluß der „common deletion“ auf die funktionellen Eigenschaften von Mitochondrien in Cybrids	39
4.4	Abhängigkeit der Flusskontrolle der Cytochromoxidase in Cybrids und in humanen Myoblasten vom metabolischen Zustand und von der „common deletion“	41
5	Diskussion	45
5.1	Auswirkungen von Deletionen in der mt-DNA auf die Eigenschaften von Muskelmitochondrien	45
5.2	Schwellenwert und funktionsändernde Verminderungen von Enzymaktivitäten	46
5.3	Nicht die Gene der mitochondrial kodierten Proteine, sondern die Gene tRNA _L , tRNA _H , tRNAs-Gene sind entscheidend für die metabolischen Konsequenzen bei Deletionen der mtDNA	48
5.4	Indirekter Hinweis of oxidativen Stress	48
5.5	Flusskontrolle von Komplex I und der Cytochromoxidase auf die Pyruvatatmung in permeabilisierten Muskelfaser	49
5.6	Abhängigkeit von I ₅₀ -Werten von der Komplexität des Untersuchungssystems	50
5.7	Experimentelle Bestimmung von Fluxkontrollkoeffizienten für die Atmung in intakten Zellen.	50
5.8	Wie ist die Kontrolle der Cytochromoxidase unter in vivo Bedingungen	51
5.9	CRABTREE-Effect	52
5.10	Auswirkungen der „common deletion“ auf die funktionellen Eigenschaften der Cybrids	54
6	Zusammenfassung	55
7	Literatureverzeichnisse	58
8	Thesen	65

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AdN	Adeninnucleotid
Co	Flusskontrollkoeffizient
CK	Kreatinkinase
COX	Cytochrom-c-oxidase
CPEO	Chronisch Progressive Externe Ophthalmoplegie
Cr	Kreatin
CrP	Kreatinphosphat
CS	Citratsynthase
Cyt.c	Cytochrom c
DCPIP	2,6-Dichlorophenolindophenol
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
ϵ	microolarer Extinktionskoeffizient
Eo	Enzymmenge
EGF	Epidermal Growth Factor
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FCS	Fötalen Kälberserums
FGF	Fibroblast Growth Factor
FG	Feuchtgewicht
Ji	Gehemmte Atmungsgeschwindigkeit
Jo	Ungehemmte Atmungsgeschwindigkeit
K_d	Dissoziationskonstante
K I	Komplex I: NADH-Coenzym-Q-Oxidoreduktase
K I+III	Komplex I+III: NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase
K II+III	Komplex II+III: Succinat-Cytochrom-c-Oxidoreduktase
K III	Komplex III: Ubiquinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase
MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactatazidose und Schlaganfallähnliche Episoden
n	empirischer Exponent
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis Pigmentosa
NCP	Nichtkollagen-Protein
PDHC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PMS	Phenazinmethosulfat
RSA	Rinderserumalbumin

RCI	Respiratorischer Kontrollkoeffizient
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SRPR	Succinatatmung bezogenen Pyruvatatmung
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien: domestizierte Bakterien mit enormer Komplexität

Das Leben auf der Erde entwickelte sich unter anaeroben Bedingungen. Als die Sauerstoffkonzentration in der Erdatmosphäre anstieg, litten Eukarionten unter Sauerstoffstreß. Die Inkorporation von Sauerstoff-reduzierenden Bakterien ermöglichte es diesen Zellen, den intrazellulären Sauerstoff auf ungiftige Konzentrationen abzusinken. In der dann folgenden allmählichen Umwandlung der zelleigenen Bakterien zu Mitochondrien wurde praktisch das gesamte bakterielle Genom in den Kern integriert. Neue Enzyme wie der Adeninnucleotidtranslokator mussten gebildet werden, um das in den domestizierten Bakterien entstehende ATP in das Zytosol der Wirtszellen transportieren zu können. In der mtDNA des Menschen verblieben nur noch 13 Proteine, die alle zur Atmungskette gehören. Um diese 13 Proteine realisieren zu können, müssen 220 kernkodierte Proteine in den Matrixraum der Mitochondrien transportiert werden. Ebenso wie die 180 Proteine, die zusammen mit den 13 mt Proteinen für die oxidative Phosphorylierung zuständig sind. Die genaue Zahl der mitochondrialen Proteine ist z.Z. noch nicht bekannt. In Hefemitochondrien kennt man bislang 750 Proteine. Etwa 20 % dieser Proteine haben eine unbekannte Funktion. Weitere 20 % sind bekannte, aber bislang nicht in Mitochondrien vermutete Proteine (Sickmann et al., 2003). So ergibt sich eine große Vielfalt in der metabolischen Ausstattung der Mitochondrien, die auch auf die Existenz bislang nicht erkannter Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien und der Wirtszelle hinweist. Es ist daher unwahrscheinlich, dass sich mitochondrial bedingte Erkrankungen nur auf Defekte in der Atmungskette, im Proteinimport oder in der Substratbereitstellung beschränken sollten. Die Untersuchung von mitochondrial bedingten Erkrankungen darf sich deshalb nicht auf nur die Atmungskette beschränken, sondern muß die metabolische Vielfalt der Mitochondrien berücksichtigen.

1.2 Genotyp - Phänotyp Beziehungen bei mitochondrialen Erkrankungen

Im Jahre 1968 wurde entdeckt, dass entkoppelte Mitochondrien die Ursache der LUFT'schen Erkrankung sind (Luft 1992). Dies war der Beginn einer Entwicklung, die heute den Mitochondrien eine Schlüsselstellung nicht nur im Energiestoffwechsel der Zelle einräumt, sondern auch ihre fundamentale Bedeutung für Leben, Pathologie und Tod der Zelle berücksichtigt (Luft 1995). Mitochondriale Enzephalomyopathien werden durch Mutationen im mitochondrialen Genom verursacht. Viele der in der mtDNA auftretenden Mutationen sind als Ursache mitochondrialer Erkrankungen erkannt worden. Bei Patienten mit kernkodierten

mitochondrialen Myopathien, sind die Mutationen erst in einzelnen Fällen bekannt (van den Heuvel und Smeitink 2001). Aber auch akute Vorgänge wie Ischämie (Di Lisa und Bernardi 1998; Gellerich et al., 2000) und Sepsis (Trumbeckaite et al., 2001) schädigen die Mitochondrien. Ebenso ist das Altern von mitochondrialen Änderungen begleitet (Murdock et al., 2000; Zhang et al., 1997; Chen et al., 2004). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson und ALS ist umstritten, ob die nachgewiesenen mitochondrialen Veränderungen sekundär sind, oder ob sie zur Pathogenese der Erkrankungen beitragen (Lestienne et al., 1990; Reichmann und Janetzky 2000; Vielhaber et al., 2000).

Mangelnde Korrelationen zwischen den genetischen Defekten und dem klinischem Zustand von Patienten mit mt-Enzephalomyopathien (Chronisch Progressive Externe Ophthalmoplegie CPEO; Mitochondrial enzephalomyopathy with lactate acidosis and stroke like episodes, MELAS; Neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa, NARP) erschweren die Diagnostik dieser Erkrankungen und sind Ausdruck unvollständigen Wissens über deren Pathogenese. Diese Probleme werden durch den Titel eines Reviews „Mitochondrial encephalomyopathies: the enigma of genotype versus phenotype“ (Morgan-Hughes und Hanna 1999) unterstrichen. Es ist kaum möglich, aus dem klinischen Zustand die Art der Mutation vorherzusagen, denn gleiche mitochondriale Erkrankungen können durch unterschiedliche Mutationen verursacht werden. So wird die CPEO durch die spontan auftretende „common deletion“, (Hurko et al., 1990), durch autosomal vererbten multiplen Deletionen (Moslemi et al., 1999) und durch die maternal vererbte Punktmutation A3243G (Silvestri et al., 1996) verursacht. Diese Punktmutation, die in den meisten Fällen bei MELAS-Patienten gefunden wird, ist ein Beispiel dafür, dass eine bestimmte Mutation verschiedene Erkrankungen verursachen kann (Hurko et al., 1990). Diese Unklarheiten haben dazu geführt, nach zusätzlichen pathogenen Mechanismen zu suchen, wie zusätzliche Mutationen (Ozawa et al., 1991; Lertrit et al., 1994; Bu et al., 1992; Guan et al., 1996), immunologische Ursachen (Harding 1992), Umweltprobleme (Prezant et al., 1993) und verschiedene Altersempfindlichkeit (Wallace 1995) oder auch unterschiedlicher genetischer Hintergrund in verschiedenen Populationen (Wallace 1995).

1.3 Akute Störungen der Mitochondrienfunktion

Weitere Gründe für scheinbar fehlende Genotyp-Phänotyp-Wechselwirkungen liegen in vielfältigen akuten Störungen der Mitochondrien z. B. durch oxidativen Stress (Luft 1995, Luft 1992), Sepsis (Trumbeckaite et al., 2001; Maria et al., 2004) und Ischämie (Gellerich et al., 2000, Jennings RB et al., 1969). Während die ischämischen Schädigungen von

Mitochondrien das erste Beispiel für mitochondrial verursachte Krankheitszustände waren (Jennings RB et al., 1969), ist der Zusammenhang zwischen geschädigten Mitochondrien und Sepsis bis heute umstritten (Gellerich et al., 2002).

Ein weitere Möglichkeit akuter Störungen der Mitochondrienfunktion besteht in der Hemmung mitochondrialer Enzyme durch Medikamente (Youssef und Badr 1992) oder Gifte (Phelka et al., 2003; Szewczyk A und Wojtczak L 2002).

Schließlich seien auch akute Störungen der Mitochondrienfunktion erwähnt, deren Ursachen außerhalb der Mitochondrien liegen. So können z.B. selbst intakte Mitochondrien bei abgesunkener cytosolischer Adeninnukleotidkonzentration nur verminderte Phosphorylierungspotentiale aufbauen (Schild und Gellerich 1998). Bei Störungen des Ryanodinrezeptors kann es wie bei der Malignen Hyperthermie zu Calciumüberladung der Mitochondrien kommen,

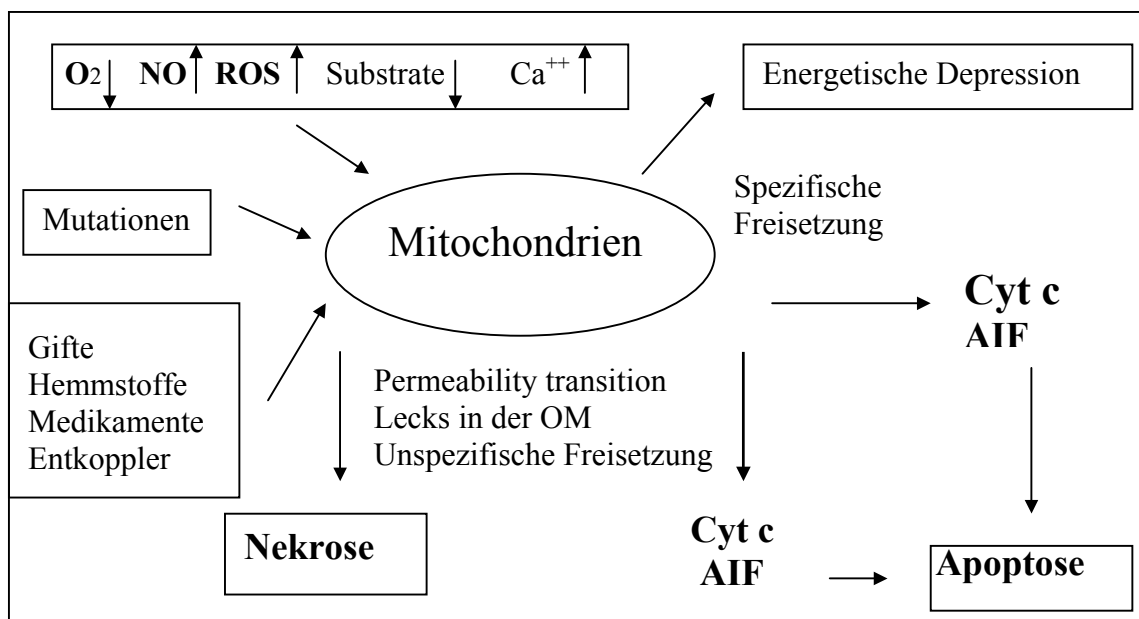


Abb.1. Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten akuter und hereditärer Störungen der Mitochondrienfunktion, die zu energetischer Depression und zum Zelluntergang führen können.

1.4 Energetische Depression des Zellstoffwechsels

Alle oben genannten akuten und hereditären Störungen der Mitochondrienfunktion können zu energetischer Depression führen (Abb.1), die durch verminderte cytosolische Phosphorylierungspotentiale und gestörtes Ca-Signalling gekennzeichnet sind. Demnach kann die Mitochondrienfunktion durch verschiedenste Ereignisse (Mutationen, Ischämie,

Intoxikation, Oxidativer Streß, Entzündungen, usw) chronisch oder akut geschädigt werden, was die Fähigkeit der Zellen zu normaler Zellarbeit vermindert. Unter anderem verlieren die Zellen die Fähigkeit zur normalen Ca-Homöostase. Ansteigendes Ca^{++} kann die Öffnung der Permeability Transition Pore bewirken. Die Freisetzung von Cytochrom c und Apoptose induzierenden Faktoren setzt Wege in Gang, die zum Zelltod führen, wobei es bei genügend hohen Phosphorylierungspotentialen zur Apoptose kommt, während bei niedrigen Phosphorylierungspotentialen Nekrose auftritt.

Das Syndrom der Rhabdomyolyse, dass bei verschiedenen metabolischen Myopathien, nach Intoxikationen, nach Entzündungen, Ischämie usw auftritt, ist wahrscheinlich ein Zustand mit maximaler energetischer Depression.

1.5 Schwellenwerte mitochondrialer Funktionsstörungen

Da jede Zelle über eine Vielzahl von Mitochondrien verfügt, die ihrerseits viele Kopien der mitochondrialen DNA besitzen, treten die Mutationen der mtDNA gewöhnlich in Heteroplasmie auf. Unklar ist die Lage der Schwellenwerte, d.h. die Heteroplasmiegrade, bei denen Funktionsdefizite funktionell nachweisbar sind. Meist werden sehr hohe Schwellenwerte von 60 - 90 % gefunden (Mazat et al., 1997; Porteous et al., 1998; James et al., 1999). Die Ursache solcher hohen Werte könnte in einer hohen Sicherheitsausstattung der Mitochondrien mit den entsprechenden Enzymen liegen. Dem widerspricht aber die Tatsache, dass schon geringe Heteroplasmiegrade zu klinischen Symptomen führen können (Deschauer et al., 2000).

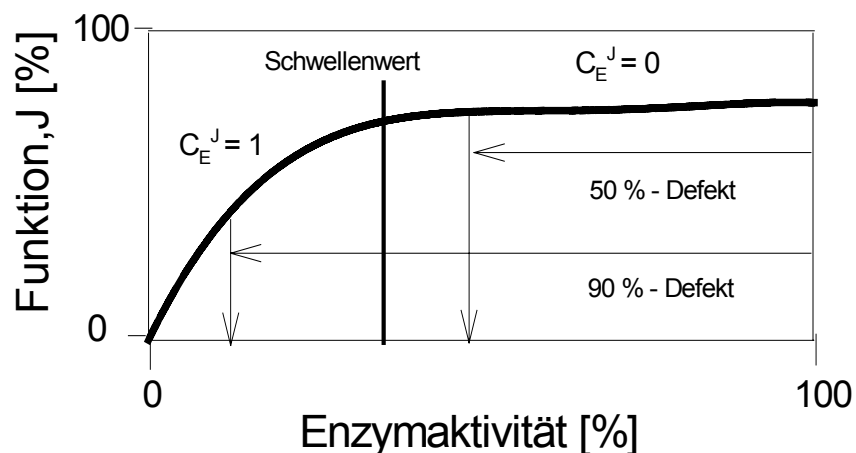


Abb. 2. Zusammenhang zwischen verminderter Enzymaktivität und Auswirkung auf die Funktion bzw. auf den metabolischen Fluß an dem das Enzym beteiligt ist

Der Nachweis mitochondrialer Ausfälle wird durch den prinzipiell variablen Mitochondriengehalt erschwert. Bei CPEO-Patienten kann man bis um das 6 fache vermehrte Aktivitäten an Citratsynthase, einem Leitenzym der Mitochondrien, finden, weshalb eine Normalisierung enzymatischer und funktioneller Daten auf den Mitochondriengehalt im untersuchten Gewebe erforderlich ist (Gellerich et al., 2003).

Es gibt keine systematischen Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen funktionellen Ausfällen an Mitochondrien und den verschiedenen Ursachen auf molekularer Ebene (mtDNA, mtEnzyme). Bei Punktmutationen in den 13 mitochondrial kodierten Proteinen sollten einfache Korrelationen zwischen der Heteroplasmie und dem Funktionsverlust auf enzymatischem Level zu erwarten sein. Die funktionellen Auswirkungen verminderter Aktivitäten einzelner Enzyme sind dagegen unübersichtlich und hängen sowohl von den Eigenschaften der betroffenen Enzyme als auch von denen des metabolischen Systems ab. Die Änderungen auf dem Niveau der Mitochondrienfunktion sollten geringer sein als die Enzymänderungen (Kacser und Burns 1995; Heinrich und Rapoport 1974; Mazat et al, 1996; Villani et al, 2000). Bei Mutationen in den t-RNA sollten demgegenüber alle 13 Proteine in ähnlicher Weise betroffen sein, was stärkere Auswirkungen auf die Mitochondrienfunktion haben müsste. Bei den meisten Deletionen sind neben Proteinen auch mehrere t-RNA betroffen. Die Auswirkung von tRNA-Ausfällen auf die mitochondrialen Proteine hängt von der biologischen Bedeutung der betroffenen Aminosäuren ab. Eine genaue Kenntnis der Zusammenhänge zwischen Mutationen und Funktion ist erforderlich, um die Pathophysiologie der mitochondrialen Erkrankungen besser zu verstehen und um Suchkriterien für weitere Mutationen zu erstellen.

1.6 Metabolische Kontrolltheorie

Die von Kacser und Burns (Kacser und Burns 1995) sowie von Heinrich und Rapoport (Heinrich und Rapoport 1974) entwickelte Metabolische Kontrolltheorie ermöglicht es, die Zusammenhänge zwischen verminderter Enzymaktivität und deren Auswirkung auf das metabolische System mit Hilfe von Flusskontrollkoeffizienten zu beschreiben.

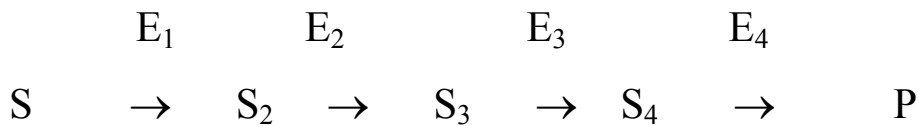
Die in isolierten Mitochondrien und permeabilisierten Muskelfasern experimentell bestimmten Flusskontrollkoeffizienten wichtiger mitochondrialer Enzyme sind sehr klein (Mazat et al, 1996). Danach wären sehr hohe Enzymänderungen erforderlich, um Funktionsänderungen zu bewirken. Unter IN VIVO-Bedingungen scheint die Kontrolle mitochondrialer Enzyme deutlich höher zu sein als IN VITRO (Villani et al, 2000; Villani et al, 1998). So fand Kunz, dass die Verfügbarkeit mitochondrialer Substrate einschließlich des

Sauerstoffs, Einfluß auf die Atmungskontrolle in permeabilisierten Muskelfasern haben soll (Wiedemann und Kunz 1998). So soll die Kontrolle der Cytochromoxidase (COX) ansteigen, wenn den Mitochondrien zusätzlich zu dem Substrat Glutamat noch Succinat angeboten wird (Kunz 2001). Es ist aber eher unwahrscheinlich, dass eine höhere IN VIVO-Kontrolle durch eine verbesserte Substratversorgung verursacht werden könnte, denn wegen der viel geringeren intrazellulären Substratkonzentrationen herrscht dort sicherlich keine Substratsättigung. In Übereinstimmung mit dieser Überlegung führen Gnaiger (Gnaiger et al, 1998) und auch Kunz (Kunz 2001) Unterschiede zwischen IN VIVO und IN VITRO-Experimenten auf die verminderte Zugänglichkeit von Sauerstoff zurück. Papa erklärt eine höhere IN VIVO-Kontrolle der mitochondrialen Enzyme mit einer AMP-abhängigen Proteinkinase, die den Komplex I regulieren soll (Papa et al, 1999). Kadenbach konnte für die COX allosterische Beeinflussungen durch Adeninnucleotide (Kadenbach und Arnold 1999) demonstrieren. Alle diese Faktoren könnten dazu beitragen, dass die Kontrolle der COX unter IN VIVO-Bedingungen höher ist als IN VITRO. Attardi hat dieses Problem inzwischen an humanen Tumorzelllinien untersucht (Villani et al, 1998). Da es ihm anscheinend nicht gelang, in diesen intakten Zelllinien Flusskontrollkoeffizienten zu messen, hat er schrittweise die Hemmung der Mitochondrienfunktion (OXPHOS mit Glutamat als Substrat) mit der entsprechenden Hemmung eines einzelnen Enzyms (COX in Gegenwart von Ascorbat und TMPD) durch jeweils den gleichen Hemmstoff (Cyanid) verglichen und daraus sogenannte Thresholdplots berechnet (Villani et al, 1998).

Möglicherweise liegt die höhere IN VIVO-Kontrolle von mitochondrialen Enzymen an der Systemabhängigkeit der Kontrolle. Schon 1983 konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle des mitochondrialen Adeninnucleotidtranslokators in Gegenwart von Pyruvatkinase (Simulation der glykolytischen ATP-Erzeugung) deutlich ansteigt (Gellerich et al, 1983). Später wurden weitere Beispiele für die Systemabhängigkeit der Flusskontrolle gefunden (Wisniewski et al, 1995; Wisniewski et al, 1993). Möglicherweise ist also die intrazelluläre Flusskontrolle der mitochondrialen Enzyme wegen der hier vorhandenen Glykolyse höher als in isolierten Mitochondrien.

1.7 Metabolische Kontrollanalyse, ein Werkzeug zur Untersuchung funktioneller Auswirkungen von Enzymdefekten

Betrachten wir ein metabolisches System, das z.B. aus 4 Enzymen besteht, die eine lineare Reaktionssequenz darstellen.



Alle vier Enzyme sind an der Umwandlung des Substrates S in das Produkt P beteiligt (Fluß, J). Von Interesse ist nun, welcher Zusammenhang zwischen den einzelnen Enzymaktivitäten (E) und dem Fluß (J) besteht. Außerdem ist es wichtig zu wissen, welchen Einfluß die einzelnen Enzymaktivitäten auf den Fluß haben. Dies lässt sich mit dem Fluxkontrollkoeffizienten beschreiben. $C_o = dJ/dE * E/J$. Dabei ist dJ die Änderung des Flusses, die durch eine Änderung der Enzymaktivität dE hervorgerufen wird. Durch Normierung auf die aktuellen Enzymaktivität E und den aktuellen Fluß erhält man C_o . Er entspricht dem Anfangsanstieg der Titrationskurven. Wenn sich der Fluß bei einer partiellen Änderung der Enzymaktivität nicht ändert (Anfangsanstieg = 0), so ist $C_o = 0$, das Enzym hat demnach keine Kontrolle auf den Fluß.

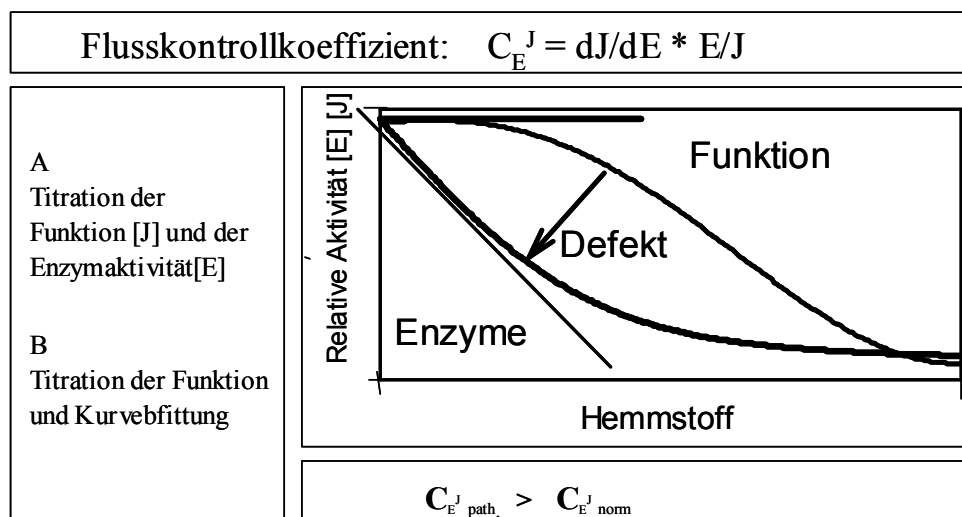


Abb. 3. Prinzip der Kontrollstärkebestimmung mit Hilfe von Inhibitortitrationsen. Der Anfangsanstieg der Titrationskurven wurde durch Tangenten markiert.

Ändert sich der Fluß in gleicher Weise wie die Enzymaktivität ($dJ = dE$, maximaler Anfangsanstieg), so ist die Kontrolle des Enzyms auf den Fluß maximal ($C_o = 1$). Alle vier Enzyme des metabolischen Systems teilen sich die Kontrolle auf den Fluß, was aus dem Summationstheorem folgt:

$$C_{01} + C_{02} + C_{03} + C_{04} = 1$$

Neuere Überlegungen gehen davon aus, dass die Summe der Kontrollstärken in streng gekoppelten Stoffwechselwegen auch 2 betragen könnte (Bianchi et al., 2004). Das Kontrollstärkemuster der Enzyme eines metabolischen Systems ist jedoch nicht konstant, sondern es ändert sich mit den metabolischen Bedingungen (Gellerich et al, 1983). Es variiert

mit der Flussgeschwindigkeit (Gellerich et al, 1983) und auch mit der Systemgröße (Gellerich et al, 1983). Da in die Berechnung von C_o auch die aktuelle Enzymaktivität eingeht, und wie in Abb 3 dargestellt, C_o mit abnehmender Ausgangsaktivität ansteigt, ist zu erwarten, dass C_o eines defekten Enzyms zunimmt. (Kunz et al, 1999; Kuznetsov et al, 1997). Dies konnte erstmals von Rigulet und Mazat gezeigt werden (Rigoulet et al, 1998).

1.8 Experimentelle Bestimmung der Flußkontrolle von Atmungskettenkomplexen

Dank der Existenz vieler spezifischer Hemmstoffe lässt sich die Aktivität mitochondrialer Enzyme durch Inhibitortitrationen schrittweise vermindern (Tabelle 1). Man misst die Aktivität des zu untersuchenden Enzyms (z.B. Cytochromoxidase) in Gegenwart steigender Inhibitormengen.

Tabelle 1
Übersicht über wichtige Hemmstoffe von Enzymen der Oxidativen Phosphorylierung

Enzymen	Hemmstoffe
Komplex I	Rotenon, Amytal
Komplex II	Malonat
Komplex III	Antimyzin A
Komplex V	Cyanid, Azid
Komplex V	Oligomyzin
AdN-Translokator	Carboxyatractylosid; Bonkretic acid
PDHC	Zinnamat

Die Form der dabei erhältlichen Inhibitorcurve hängt von der Affinität des Enzyms zum Inhibitor und von dessen Hemmtyp ab. In einen zweiten Ansatz wird dann die mitochondriale Atmung durch Titration mit dem gleichen Inhibitor untersucht. Da die Atmung von allen Enzymen der oxidativen Phosphorylierung kontrolliert wird und nicht nur von der Cytochromoxidase, wird die Atmung durch Zyanid nicht so empfindlich gehemmt wie das Enzym selbst. Der Anfangsanstieg der Titrationskurve für die Atmung ist deshalb viel geringer als der des isolierten Enzyms. Der Quotient aus den Anstiegen der Atmung und des Enzyms ist dem C_o der Cytochrom Oxidase proportional.

Für viele Enzyme kann man die isolierte Aktivität nicht messen. Deshalb wurde die Methode der Inhibitor-Fittung entwickelt (Gellerich et al, 1990). Hier begnügt man sich mit der Titration der Mitochondrienfunktion im intakten metabolischen System. Die dabei erhältliche Titrationskurve hängt von der C_o und auch von der Dissoziationskonstanten (K_d) für den Komplex aus Enzym und Hemmstoff ab. Da K_d für jeden Hemmstoff separat gemessen werden kann, ergibt sich die Möglichkeit C_o aus der Funktionstitrationskurve mit Hilfe eines Computermodells und nichtlinearer Regression zu fitten (Weitere Einzelheiten sind s. Methodik). Abbildung 4 zeigt ein Beispiel. Hier wurde die aktive Succinatatmung von Lebermitochondrien mit Carboxyatractylosid titriert, einem Hemmstoff des AdN-Translokators. Folgende Parameter können gefittet werden: J_o = Ungehemmte Atmungsgeschwindigkeit, J_i = Gehemmte Atmungsgeschwindigkeit, K_d = Dissoziationskonstante, C_o = Fluxkontrollkoeffizient, E_o = Enzymmenge, n = empirischer Exponent.

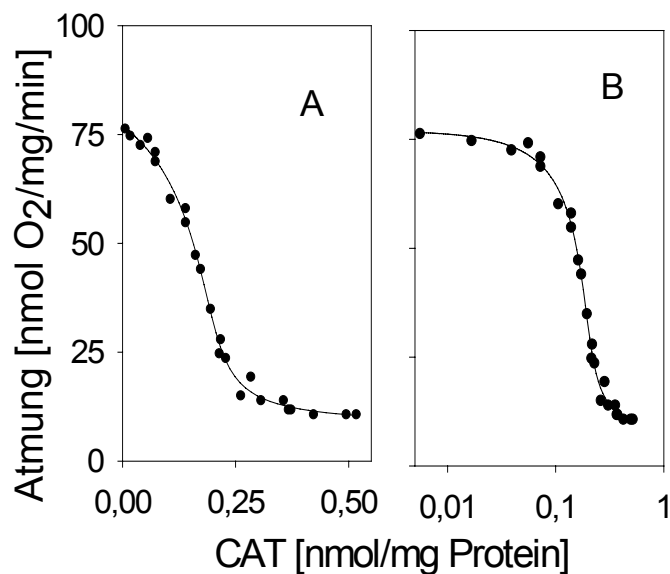


Abb. 4. Experimentelle Bestimmung von C_o des Adeninnucleotidtranslokators durch Titration mit Carboxyatractylosid. (Nach Gellerich et al., 1990). Rattenlebermitochondrien wurden nach Standardmethoden isoliert und respirometrisch unter state 3 Bedingungen mit Succinat als Substrat untersucht. Die Abbildung zeigt die stationären Atmungsraten von 4 Einzelinkubationen in denen die Hemmstoffkonzentration schrittweise erhöht wurde. Fittungsparameter: $K_d = 0,0019$ nMol/mg, $J_o = 77$ nmol O_2 /min/mg, $J_i = 8$ nmol O_2 /min/mg, $C_{oADNT} = 0,22$, $r^2 = 0,998$.

Abb 4 zeigt die Titrationskurve für Lebermitochondrien, die mit Carboxyatractylat gehemmt wurden. In der Legende wurden gefitteten Parameter angegeben. Der Vorteil des Inhibitor-Fitungsverfahrens zur Bestimmung von Fluxkontrollkoeffizienten besteht darin, dass nur der

Fluß mit dem entsprechenden Hemmstoff titriert werden muß. Das individuelle Enzym braucht während des Experiments nicht titriert zu werden. Allerdings muß man die Dissoziationskonstante kennen. Alternativ kann man den Fluß und die Enzymaktivität titrieren. In einem Vergleich beider Methoden konnte gezeigt werden dass beide zu gleichen Ergebnissen führen (Rossignol et al., 1999). Es besteht auch die Möglichkeit, Stoffwechselwege zu Blöcken zusammenzufassen und für diese Kontrollkoeffizienten zu definieren. So konnte z.B. in Spermien der Einfluß der oxidativen Phosphorylierung und der kontraktilen Proteine auf das cytosolische ATP/ADP- Verhältnis untersucht werden, indem entweder die Mitochondrien mit Antimyzin A (ATP/ADP –Quotient sinkt) oder die Myosin-ATPase mit Vanadat (ATP/ADP-Quotient steigt) titriert werden, obwohl in beiden Fällen die Spermienmotilität sinkt. Dieses von Bohnensack entwickelte Verfahren (Halangk und Bohnensack 1986) wurde später von Brandt und Brown zum "Top-Down"-Approach ausgebaut (Brandt 1998).

2 Zielstellung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, qualitative und quantitative Genotyp-Phänotyp-Beziehungen in Muskelbiopsien von CPEO-Patienten und an cybrids mit „single deletions“ aufzufinden. Ferner sollten die Flusskontrollkoeffizienten für die COX und Komplex I (Co_{COX} , $Co_{Komplex\ I}$) auf die mitochondriale Atmungsgeschwindigkeit in permeabilisierten Muskelfasern von Gesunden und CPEO-Patienten untersucht werden. Weiterhin bestand die Aufgabe die Co_{COX} in intakten menschlichen Zellen unter verschiedenen metabolischen und pathologischen Zuständen zu messen. Als pathologische Veränderung sollten die „single deletions“ von CPEO-Patienten dienen, deren Deletionsgröße zwischen 2,6 und 9 kB variierte. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1.) Welchen Einfluß haben Deletionen der mtDNA auf die Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern von CPEO-Patienten.
- 2.) Wie wirken sich die unterschiedlichen Deletionsgrößen auf die Enzym- und Funktionsverluste aus.
- 3.) Bei welchem Heteroplasmiegrad liegt der Schwellenwert für Funktionsverluste?
- 4.) Lassen sich die Auswirkungen der Deletionen auf die Mitochondrienfunktion in Muskelfasern mittels veränderter Fluxkontrollkoeffizienten der Cytochromoxidase und von Komplex I beschreiben?
- 5.) Läßt sich die Flußkontrolle mittels Inhibitortitrationen in intakten Muskelzellen bestimmen?
- 6.) Wirken sich veränderte metabolische Zustände auf die in intakten Zellen gemessenen Flußkontrolle aus.
- 7.) Welchen Einfluß hat die „common deletion“ auf die Co_{COX} in Cybrids.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Hemmstoffe

Succinat, Ascorbat, TMPD, Decylubichinon, DCPIP, PMS, Acetyl-Coenzym A, NADH, Oxalacetat, Pyruvat, Cytochrom c aus Pferdherz, Rinderserumalbumin, DTNB und alle Hemmstoffe (Atractylat, Rotenon, Antimycin A aus *Streptomyces* sp., Natriumazid, KCN) wurden von Sigma bezogen. Taurin, KCL wurden von Merk, CrP von ICN und Mannitol von Serva bezogen. KH_2PO_4 stammte von Reanal. Alle anderen Medienzusätze und Puffersubstanzen (MES, Dithiothreitol, Imidazol, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, EGTA, KOH, CaCO_3 , Saccharose, Tris) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. ADP kam von Roche. FCS (Fetales Kälberserum), Penicillin, Streptomycin, Trypsin, Trypanblau und DMEM Medium (mit 4,5g/L Glucose für Cybridzellen, mit 1g/L Glucose für Glattenzellen) von Biocherom KG; Uridin (Cell culture tested) von Sigma und das Skeletal muscle cell Growth Medium Kit (für Myoblasten) kam von Promo Cell GmbH.

3.2 Puffer, Medien und Medienzusätze

Storage Puffer. Die Lagerung und Permeabilisierung von Muskelfasern erfolgte in einem Storagepuffer mit folgender Zusammensetzung: 49 mM MES, 3 mM KH_2PO_4 , 20 mM Taurin, 0,5 mM Dithiothreitol, 20 mM Imidazol, 9,5 mM MgCl_2 , 5,2 mM ATP, 15 mM CrP, 1,9 mM $\text{K}_2\text{-Ca-EGTA}$, 8,1 mM K-EGTA , PH 7,1.

Inkubationsmedium für die Untersuchung der Mitochondrienfunktion. Die respirometrische Untersuchung der Mitochondrien erfolgte in einem Inkubationsmedium mit folgender Zusammensetzung: 5 mM MgCl_2 , 75 mM Mannitol, 25 mM Saccharose, 20 mM Tris, pH 7,4, 100 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 1mg/ml Rinderserumalbumin. Das Medium wurde bis zur Verwendung bei -18°C gelagert.

Homogenisationsmedium. Die Homogenisation der Zellen und der Skelettmuskeln für enzymatische Untersuchungen erfolgte in einem modifizierten Chappel-Perry Medium mit folgender Zusammensetzung: 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,5. Das Medium wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Medien für Zellenkultur. Die Inaktivierung des Fetalen Kälberserums (FCS) erfolgte durch Erwärmen auf 56°C im Wasserbad für 30 min. Die Sterilisierung der 0,5%igen Uridinlösung erfolgte durch Filtration mit $0,22 \mu\text{m}$ PVDF, Rotilabo-Spritzenfiltern von ROTH. Die Antibiotika (Penicilin G und Streptomycin) wurden in sterilem Wasser gelöst. Aliquote dieser Lösungen wurden in sterilen Röhrchen eingefroren und bei -20°C gelagert.

Medium für glatte Gefäßmuskelzellen. 50 ml inaktiviertes FCS, 100 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin G wurden je 500 ml Dulbecco`s modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 1g/l Glukose zugegeben.

Medium für Cybridzellen. 50 ml inaktiviertes FCS, 100 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin G, 50 mg/l Uridine und 100 mg/l Pyruvat wurden in je 500 ml DMEM Medium mit 4,5g/L Glucose gegeben.

Medium für Myoblasten. Nach Auftauen des Supplementpacks wurden (FCS 25 ml, Epidermal Growth Factor (EGF) 5,0 µg/500 µl, basic Fibroblast Growth Factor (FGF) 0,5 µg/500 µl, bovine Fetuin, 25 mg/500 µl, Insulin 5 mg/500 µl, Dexamethasone 200 mg/500 µl, Gentamicin 25 mg/250 µl, Amphotericin B 25 µg/500 µl) in Skeletal Muscle Cell Basal Medium zugegeben.

3.3 Untersuchungsgut

Kultivierte Zellen. Die menschlichen Myoblasten erhielten wir von Dr. Lochmüller über die DGM-Zellsammlung in München. Die glatten Gefäßmuskelzellen waren humane Primärkulturen, die wir von Dr. Loppnow (Klinik für Innere Medizin der MLU Halle Wittenberg) erhielten. Die Cybridzellen stammten von Prof. Wei aus Tapei.

Muskelbiopsien. Kontrollmuskelbiopsien wurden von Patienten ohne Muskelerkrankungen erhalten, was durch klinische, elektromyographische, histologische, enzymatische, respirometrische und genetische Standardmethoden gesichert wurde. Die Diagnose der CPEO-Patienten wurde nach positiven klinischen, elektromyographischen, histologischen, enzymatischen, respirometrischen und genetischen Befunden erstellt. Die Patienten waren zwischen 45 und 76 Jahre alt. Es wurden Patienten beiderlei Geschlechts einbezogen.

3.4 Geräte

Die respirometrischen Messungen wurden mit dem Oxygraphen OROBOROS®, der Firma OROBOROS, Innsbruck, Österreich, durchgeführt. Die spektralphotometrischen Messungen erfolgten am Photometer Cary WinUV 50 Varian Australia Pty Ltd. Zur Herstellung der Muskel- und Zellhomogenate dienten Glas/Glas- Handhomogenisatoren (Kontes Glass Co., Vineland, NJ, 2 ml und 7 ml). Die Materialien wurden auf einer elektronischen Präzisionswaage KERN 770/GS/GJ, Albstadt, BRD, gewogen. Zur Herstellung von rediziertem Cytochrom c wurden spezielle SEPHADEX-Säulen, Typ G-25M, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden verwendet. Die Handhabung der Medien und der Zusätze

erfolgte in einer Reinraumwerkbank von Heraeus Instruments GmbH. Die Zellen wurden im Begasungsbrutschrank BB16 von Heraeus Instruments GmbH gezüchtet. Die mikroskopischen Arbeiten bei der Zellzucht erfolgten mit dem Umkehrmikroskop (Axiovert 100) von Carl Zeiss Jena GmbH. Zentrifugationen erfolgten in der Tischzentrifuge GS-15R von SPINCO BUSINESS CENTER, BECKMAN INSTRUMENTS, INC.. Für Inkubationen fand das Wasserbad von Medingen, Dresden, Verwendung. Gewebekulturflaschen (steril, 550ml, 175cm², mit Filter) waren von Greiner Labortechnik GmbH.

3.5 Zellkultur

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden in DMEM Medium unter Zusatz von 1g / l Glukose kultiviert. Für die Cybridzellen wurde dem DMEM Medium 4,5g / l Glukose zugesetzt. Für Myoblasten fand Skeletal Muscle Cell Growth Medium Verwendung. Alle Zellarten wurden bei 37° C in einer 5% CO₂ enthaltenden Atmosphäre gezüchtet.

Medienwechsel. Vor Verwendung wurden die Medien im 37°C Wasserbad erwärmt. Der Medienwechsel erfolgte in der Reinraumwerkbank, die 30 min vor Arbeitsbeginn eingeschaltet und gesäubert wurde. Die Kulturflaschen wurden aufgeschraubt. Die Deckel wurden mit den mit Öffnungen nach unten abgelegt. Mit einer Pasteurpipette, die durch den Schlauch mit der Saugflasche verbunden war, wurde das Medium völlig abgesaugt. Danach wurde 25 ml frisches Medium mit der 25 ml-Pipette auf die der Kultur gegenüberliegenden Seite der Kulturflasche ohne Schaumbildung einpipettiert. Die Kulturflaschen wurden wieder verschlossen und in den Brutschrank verbracht.

Subkultivierung. Die Medien wurden aus den Kulturflaschen abgesaugt und durch 8 ml vorgewärmte Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA in PBS Lösung) ersetzt. Nach 10-minütiger Trypsinierung bei 37°C wurde die Zellsuspension in eine sterile Pipette aufgenommen und in ein steriles Röhrchen gegeben. Die Kulturflaschen wurden mit der gleichen Menge an frischem Medium nachgespült.

Die Zellsuspension wurde dann bei 1200 RPM und einer Temperatur von 20°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, während das Pellet in 40 ml frischem Medium vorsichtig (ohne Schaum) resuspendiert wurde. Nach der Zellzahlbestimmung wurden entsprechende Aliquote entnommen, mit frischem Medium auf eine Konzentration von 2500 Zellen/cm³ verdünnt und in neuen Kulturflaschen weiter kultiviert.

Zellzahlbestimmung. Die Zellzahl wurde in Hämocytometern bestimmt. Zuerst wurden die Zählkammern und die Deckgläser sorgfältig mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Dann wurde ein Deckglas leicht anfeuchtet und auf die Zählkammer gelegt. Danach wurde die

Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt. Unter dem Mikroskop wurden jeweils 8 große Quadrate ausgezählt. Die Multiplikation des Mittelwertes mit 10^4 ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

Vorbereitung der kultivierten Zellen für oxygraphische Messung. Der beste Zeitpunkt für oxygraphische Untersuchungen von kultivierten Zellen liegt bei einer bis maximal 5 Stunden nach der Trypsinierung. Die Zellsuspension wurde bei 1200 RPM und 20°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 20 ml Inkubationsmedium resuspendiert. Diese Waschung wurde einmal wiederholt. Das dabei erhaltene Pellet wurde in einer geringen Menge Inkubationsmedium aufgenommen. Die Zellzahl in einem ml Stammlösung betrug 30×10^6 Cybrids /ml bzw 20×10^6 glatte Gefäßmuskelzellen bzw Myoblasten/ml.

Herstellung von Zellhomogenaten

Nach Trypsinierung und Zellzählung wurden die Zellsuspensionen bei 1200 RPM und 20°C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 20 ml Chappell-Perry Medium gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in Chapell-Perry Medium bei einer Zellkonzentration von 20×10^6 Zellen/ ml resuspendiert und danach 10 min in einem auf Eis vorgekühlten Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert.

3.6 Aufarbeitung der Muskelproben

Präparation des Muskelmaterials. Die möglichst wenig traumatisierte Muskelprobe von etwa 200 bis 400 mg Feuchtgewicht wurde sofort nach Entnahme auf einer mit Storagepuffer befeuchteten, eisgekühlten Petrischale abgelegt. Die Aufbereitung der Muskelproben erfolgte nach der von Veksler beschriebenen Methode der „skinned-fiber“-Technik (Veksler et al., 1987). Der Muskel wurde in einer gekühlten Petrischale präpariert. Dabei wurde er von eventuell vorhandenem Fettgewebe und Faszienmaterial befreit und vorsichtig mit Hilfe von Kanülen grob zerfasert. Die Fasern wurden in 10 ml auf 4 °C vorgekühlten Storagepuffer überführt. Während des Transportes zum Labor war die ununterbrochene Kühlung auf Eis gewährleistet.

Permeabilisieren der Muskelfasern. Etwa 25 mg Muskelgewebe wurden im Kühlraum auf einer Petrischale möglichst fein in einzelne Faserbündel zerfasert. Diese Faserbündel wurden in 1 ml Storagepuffer, welchem 50 µg Saponin zugesetzt war, überführt. In dieser Lösung wurden die Fasern 30 Minuten bei 4 °C unter vorsichtigem Rühren auf einem Minishaker (Rührergeschwindigkeit=100 RPM) inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Muskelfasern zur

Entfernung des Saponins und der Adeninnukleotide des Storagepuffers viermal in 2 ml eiskaltem Inkubationsmedium gespült.

Herstellung von Muskelhomogenaten. Die Herstellung des Muskelhomogenates erfolgte aus Proben, die in flüssigem Stickstoff eingelagert waren. Dazu wurden etwa 30 mg Skelettmuskel abgewogen und sofort in eiskaltem Chappell-Perry-Medium im Verhältnis 1:30 (Gewicht/Volumen) 7 Minuten lang homogenisiert. Das Homogenat verblieb bis zu den Messungen, die innerhalb einer Stunde durchgeführt wurden, auf Eis.

3.7 Oxygraphische Untersuchung der Mitochondrienfunktion in intakten Zellen

Alle Messungen wurden bei 30° C mindestens als Zweifachbestimmungen durchgeführt. Die durchschnittliche Zellzahl betrug 2×10^6 Zellen/ml für Myoblasten und glatte Gefäßmuskelzellen und 3×10^6 Zellen / ml für die Cybridszellen. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 1,42 ml. Die Messungen erfolgten in OROBOROS® Oxygraphen. Dieser Oxygraph bietet die Möglichkeit, in zwei separaten, temperierbaren und gerührten (350 RPM) Messzellen mit Clark-Elektrode (Abb. 5) zu arbeiten. Die Registrierung der Sauerstoffkonzentration über der Zeit und der ersten Ableitung dieses Signals (Atmungsgeschwindigkeit) wurde mit dem Computerprogramm DATGRAPH Analysis Software, OROBOROS®, durchgeführt.

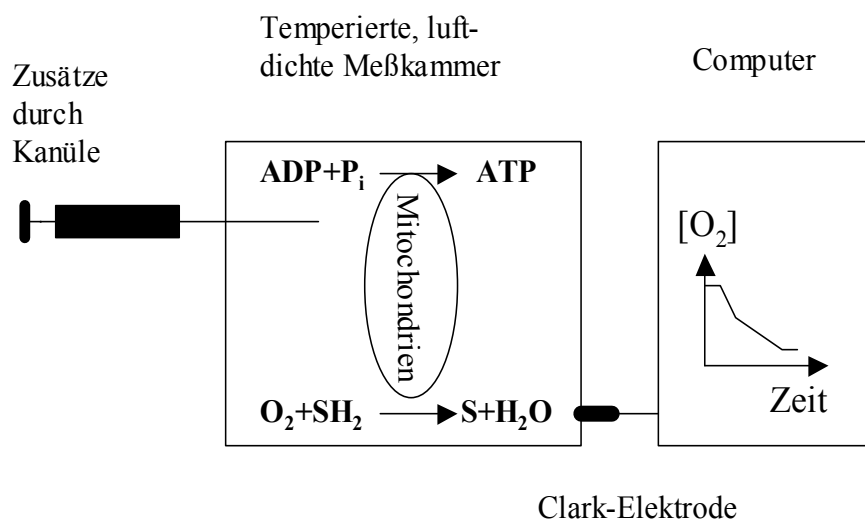


Abb. 5. Respirometrische Untersuchung der Mitochondrienfunktion im Oxygraphen (schematische Darstellung). CLARK-Elektrode zur Messung der Sauerstoffkonzentration. SH₂: Substrat; S: oxidiertes Substrat. Die Eichung des Gerätes erfolgte aus der Differenz der Messwert für luftgesättigtes Medium vor und nach Zugabe von Dithionit (Na₂S₂O₄). Der Sauerstoffgehalt des belüfteten Inkubationsmediums bei 30°C wurde mit 200 nmol O₂/ml angenommen (Sperl et al., 1997).

3.8 Bestimmung von Flusskontrollkoeffizienten

Die experimentelle Bestimmung von Flusskontrollkoeffizienten erfolgte mit Hilfe von Inhibitortitrationen. Die Cytochromoxidase wurde mit Azid oder Cyanid titriert, während Komplex I der Atmungskette mit Amytal untersucht wurde. Die Inhibitorzusätze wurden so gewählt, dass der gesamte Aktivitätsbereich durch Messpunkte abgedeckt war. Erst nach Erreichung stationärer Atmungsraten erfolgte der nächste Inhibitorzusatz. Experimente mit nicht stationären Atmungsraten wurden verworfen. Wenn möglich, wurden die Experimente mindestens 3 mal wiederholt. Bei der Untersuchung humaner Muskelbiopsien waren jedoch meist nur Einzelmessungen möglich. Die gemittelten Atmungsgeschwindigkeiten wurden entweder absolut oder normiert über der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die entsprechenden SigmaPlot-Files wurden dann zur Fittung der Parameter in das Programm TableCurve eingelesen. Der Fittung lag die auf Seite erwähnte Gleichung zugrunde. Diese wurde in das Computerprogramm Tablecurve implementiert. 5 Parameter können einzeln gefittet oder aber konstant gesetzt werden. Die Messdaten werden über eine EXEL Datei eingelesen. Zunächst erfolgt durch manuelle Variation der Parameter ein Grobabgleich, an den sich über nichtlineare Regression eine Fittung anschließt. Die Qualität des Fits wird mittels R^2 bewertet (maximal 1).

3.9 Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivitäten

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte spektralphotometrisch bei 30°C in Doppelbestimmung mit unterschiedlichen Homogenatmengen. Zur Messung von zellulären Enzymen wurden Stammhomogenate mit jeweils 20 Millionen Zellen / ml Chappel-Perry Puffer verwendet.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach modifizierten Formel, die sich vom Lambert Beerschen Gesetz ableitet:

$$\frac{U/10^6 \text{ Zellen}}{(U/gFG)} = \frac{\Delta E/\text{min} * V_m * F_v}{\epsilon * V_p}$$

$\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung pro Minute (Anfangsgeschwindigkeit)

V_m : Messvolumen in der Küvette (μl)

F_v : Verdünnungsfaktor

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_p : Probenvolumen (μl)

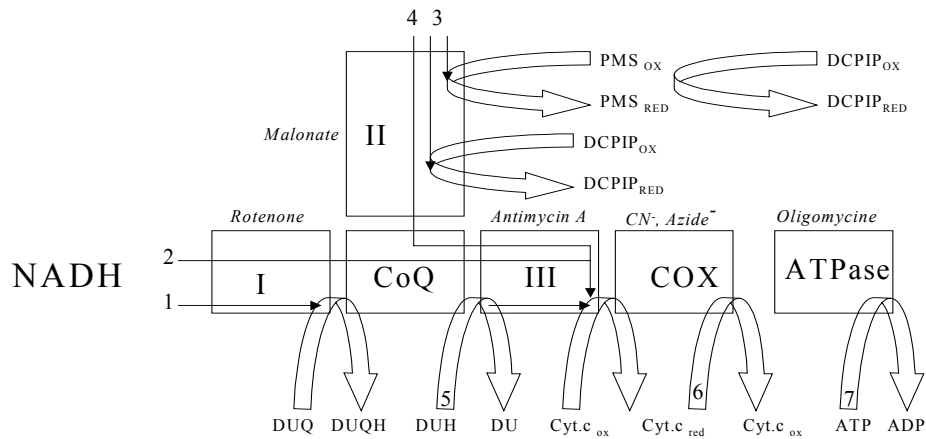


Abb. 6. Enzymatische Untersuchungen der Komplexe der Atmungskette (Metabolisches Schema). Komplexe I, II, III, CoQ: Coenzym Q . ATPase. In Kursivschrift: Hemmstoffe für die Komplexe der Atmungskette. 1: NADH:Quinone-Oxidoreduktase (Komplex I). 2: Rotenone empfindliche NADH:Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex I+III). 3: Succinat-Dehydrogenase (Komplex II). 4: Succinat-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex II+III). 5: Quinone-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III). 6: Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV). 7: F₀F₁-ATPase (Komplex V). DU: Decylubichinon. DUH: Decylubichinol. Cyt. C: Cytochrom c. PMS: Phenazin-Methosulphat. DCPIP: Dichlorophenol-Indophenol. Red: reduziert. Ox: oxidiert.

3.9.1 Komplex I (NADH-Coenzym-Q-Oxidoreduktase)

Das Test-Prinzip wurde in Abb.6 dargestellt. NADH wird durch die NADH:Coenzym-Q-Oxidoreduktase oxidiert. Die Reaktion vor und nach Hemmung mit Rotenon entspricht der Enzymaktivität. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Testansatz: 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,4; 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 3 mM KCN, 5 μg / ml Antimycin A. Start: 60 μM CoQ und 100 μM NADH. Nach 2 Minuten wurde 10 μM Rotenon zugegeben und weiter registriert.

3.9.2 Komplex I+III (NADH:Cytochrom c-Oxidoreduktase)

Die Bestimmung geht auf Hatefi (Hatefi und Rieske 1967) zurück (s. Abb.6). Cytochrom c wird sowohl durch die NADH:Cytochrom-c-Oxidoreduktase als auch durch die NADH:Cytochrom-b₅-Oxidoreduktase reduziert (Szczęsna-Kaszmarek et al., 1984). Da für die zweite Reaktion kein Hemmstoff existiert, wird Komplex III selektiv durch Zugabe von Antimycin A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ansatz) gehemmt. Die nach der Hemmung verbleibende Restaktivität

entspricht der Aktivität der NADH: Cytochrom b_5 -Oxidoreduktase. Die Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen ($\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Testansatz: 50 mM K-Na-Phosphat Puffer, pH 8,0; 0,1 mM EDTANA, 3 mM KCN, 80 μM Cytochrom c, 5 $\mu\text{g/ml}$ Antimyzin A. Start: 0,2 mM NADH.

3.9.3 Komplex II+III (Succinat: Cytochrom-c-Oxidoreduktase)

Zum Testprinzip s. Abb. 6. Cytochrom c wird durch die Succinat: Cytochrom-c-Oxidoreduktase reuziert (Tisdal 1967). Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen ($\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Testansatz: 50 mM Phosphat Puffer, pH 7,4; 0,2 mM EDTA-Na, pH 7,4; 10 mM Succinat, 1% Rinderserumalbumin, 3 mM KCN. Start: 80 μM Cytochrom c_{ox} .

3.9.4 Komplex III (Ubichinol: Cytochrom-c-Oxidoreduktase)

Gemessen wurde die Reduktion von Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm in Gegenwart von Decylubichinol ($\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Krähenbühl 1994). Die Aktivität von Komplex III wurde aus der Differenz der Antimyzin A resistenten Aktivität und der gesamten Aktivität ermittelt.

Testansatz: 50 mM Phosphat-Puffer, pH 8,0; 0,1 mM EDTA-Na; 0,2 % Rinderserumalbumin; 3 mM KCN; 60 μM Cytochrom c_{ox} ; 5 $\mu\text{g/ml}$ Antimyzin A. Start: 150 μM Decylubichinol.

Herstellung von Decylubichinol. 1 ml einer 0,01 M Decylubichinon-Lösung in Ethanol (pH 2,0) wurde mit einer kleinen Spatelspitze KBH_4 und 1 ml bidestilliertem Wasser gemischt und ständig gerührt, bis die Lösung farblos war. Danach wurden 2 ml Ether und 1 ml Cyclohexan hinzugefügt und gut gemischt. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit Stickstoff durchblasen, bis das Gemisch verdunstet war. Die verbliebene Substanz wurde mit 1 ml Ethanol, pH 2 aufgelöst und bis zur Verwendung bei -18°C gelagert (Ragan 1987).

3.9.5 Cytochrom -c-Oxidase (COX)

Reduziertes Cytochrom c wird durch Cytochrom-c-Oxidase oxydiert (s. Fig.6). Gemessen wurde die Oxidation von reduziertem Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm ($\epsilon = 19,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

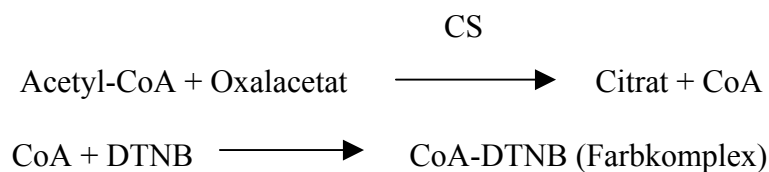
Testansatz: 60 μM Cytochrom c_{red} ; 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0; Start: 30 μl (20×10^6 Zellhomogenat/ml) oder 10 μl (Muskelhomogenat, 1:30).

Herstellung des reduzierten Cytochrom c. 20 mg Cytochrom c wurde in 1 ml 20 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst und mit 10 mg Ascorbat/ml Lösung reduziert. Die Trennung des Reduktionsmittels vom reduzierten Cytochrom c, erfolgte gelchromatographisch mit 20 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4), über einer speziellen SEPHADEX-Säule (Typ G-25 M; Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden), mit einem Bettvolumen von 17,6 ml. Das Eluat wurde in Aliquote aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -18°C gelagert.

Bestimmung des Redoxgrades der Cytochrom c-Lösungen. Man registriert das Spektrum der Cytochrom c-Lösung zwischen 500 und 600 nm, wobei die Küvette 20 μl Cytochrom-c-Lösung, 100 μl 0,1 M Phosphatpuffer und 880 μl Aqua bidest enthält. Durch Zusatz einer Spatelspitze des Reduktionsmittels Ascorbat wird das Cytochrom c vollständig in die reduzierte Form überführt. Aus der Differenz der Extinktionen bei 550 nm vor und nach Zugabe des Reduktionsmittels kann der prozentuale Anteil an reduziertem Cytochrom c berechnet werden. Um bei den Cytochromoxidasebestimmungen Fehler durch eventuell anwesendes Reduktionsmittel ausschließen zu können, sollte der Reduktionsgrad bei etwa 90 % liegen (Wharton und Tzagaloff 1967). Zur Messung des Anteils an reduziertem Cytochrom c in oxidiertem Cytochrom c verfährt man ähnlich. Jedoch wird statt Ascorbat eine Spatelspitze von dem Oxidationsmittel Kalium Hexacyanoferrat III zugesetzt.

3.9.6 Citratsynthase (CS)

Testprinzip:



Das durch die CS gebildetet CoA bildet mit DTNB einen photometrisch detektierbaren Farbkomplex. Gemessen wurde die Zunahme der Extinktion von CoA-DTNB bei einer Wellenlänge von 412 nm ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Sheperd und Garland 1969).

Testansatz: 45,5 mM Tris-Puffer, pH 7,4; 0,1 mM DTNB (in 0,1 M Tris, pH 8,0); 0,1 mM Acetyl-CoA. Start: 0,5 mM Oxalacetat. Die Oxalacetat-Lösung wurde jeden Tag frisch hergestellt und mit 1 M KOH auf einen pH-Wert von 6,0-7,0 eingestellt. Auch Acetyl-CoA sollte frisch sein.

3.9.7 Succinat-Dehydrogenase (SDH)

Succinat wird durch die Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat oxydiert, dazu werden Phenazinmethosulfat (PMS) und 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) als Elektronenakzeptor bzw terminaler Elektronenakzeptor benötigt. Gemessen wurde die Reduktion von 2,6-Dichlorophenolindophenol bei einer Wellenlänge von 600 nm ($\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$). Die Reaktion ist durch Malonat vollständig hemmbar. (Arrigon und Singer 1962).

Testansatz: 50 mM Phosphat-Puffer, pH 7,4; 0,1 mM Na EDTA; 0,1 % Rinderserumalbumin; 3 mM KCN; 10 mM Succinat; Start: 35 μM DCPIP und 1,63 mM PMS. Die PMS-Lösung wurde jeden Tag frisch hergestellt.

3.10 Statistische Verfahren

Die Zusammenfassung der einzelnen Experimente erfolgte über die Berechnung von Mittelwerten \pm Standardabweichung mit Hilfe des Computerprogrammes „Sigma-plot“. Die Statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes „Sigma Stat for windows version 1.0 TM“. Signifikanzanalysen wurden mit dem t-Test durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied angesehen. Generell erfolgt die Fehlerangabe in dieser Arbeit als Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Veränderungen in Muskelmitochondrien von CPEO Patienten mit „single deletions“

4.1.1 Der Zusammenhang zwischen Atmungsraten und den Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe in der Skelettmuskulatur von CPEO-Patienten

Die funktionellen Eigenschaften und die Aktivitäten der Atmungskettenenzyme von Muskelmitochondrien in 25 CPEO Patienten im Vergleich zu 22 gesunden Kontrollen wurden in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2

Enzymaktivitäten und funktionelle Eigenschaften in Muskelmitochondrien von CPEO-Patienten mit single Deletions im Vergleich zu gesunden Patienten. Die funktionellen Eigenschaften der Mitochondrien wurden respirometrisch in permeabilisierten Fasern aus Muskelbiopsien gemessen. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte in Homogenaten von tiefgefrorenen Muskelbiopsien. Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * nmol O₂/min/mg Probe; #[nmol O₂/min/U CS], RCI = respirometrischer Kontroll Index (state 3 Atmung_{Pyruvat}/CAT-insensitive Atmung)[§], [μ Mol / min /g non collagen protein]. §, Auf die Citratsynthase in der gleichen Probe normierte Aktivität in %. Änderungen im Vergleich zur Kontrolle. \uparrow, \downarrow , $p < 0,01$, \uparrow^*, \downarrow^* $p < 0,05$. Außerdem wurden die individuellen Meßwerte dreier CPEO-Patienten einschließlich der Deletionsgröße und der deletierten Gene angegeben. Patient 1: 9 kB (Cyt. b, ND 3,4,5,6 COX II, III, ATPase 6,7). Patient 2: 4,9 kB (ND 3,4,5 COX III, ATPase 6,8). Patient 3: 2,6 kB (ND 4,5). Zusätzlich waren bei allen Patienten die Gene der tRNA für Leucin, Serin und für Histidin deletiert. $\uparrow\downarrow^{\S}$, Kennzeichnung der Meßwerte, die außerhalb der Kontrollbereiche lagen. Die letzte Spalte zeigt die Änderungen aller CPEO Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen.

	Gesunde Patienten (n=22)	CPEO Patienten (n=13-25)	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Änderung [%]
Pyruvat*	1,35 \pm 0,29	0.81 \pm 0.34 (n=14)	0.35 \downarrow^{\S}	0.93	0,75 \downarrow^{\S}	-40 %
Pyruvat/CS [#]	167 \pm 41	69 \pm 17 \downarrow (n=14)	44 \downarrow^{\S}	56 \downarrow^{\S}	48 \downarrow^{\S}	-59 %
SRPR [%]	117 \pm 15	89 \pm 28 \downarrow^* (n=13)	n.d.	95 \downarrow^{\S}	46 \downarrow^{\S}	-23 %
CS [§]	64 \pm 18	129 \pm 73 \uparrow (n=25)	55	131 \uparrow^{\S}	109 \uparrow^{\S}	+103 %
COX [§] [%]	124 \pm 31	55 \pm 19 \downarrow (n=25)	51 \downarrow^{\S}	48 \downarrow^{\S}	54 \downarrow^{\S}	-56 %
III [§] [%]	176 \pm 54	84 \pm 34 \downarrow (n=24)	89 \downarrow^{\S}	53 \downarrow^{\S}	82 \downarrow^{\S}	-52 %
II+III [§] [%]	31 \pm 9	15 \pm 9 \downarrow (n=25)	12 \downarrow^{\S}	18 \downarrow^{\S}	24	-52 %
I+III [§] [%]	12 \pm 7	3,9 \pm 2,8 \downarrow (n=24)	2 \downarrow^{\S}	3 \downarrow^{\S}	6 \downarrow^{\S}	-33 %
I [§] [%]	21 \pm 7	11 \pm 6 \downarrow^* (n=14)	n.d.	7 \downarrow^{\S}	n.d.	-46 %
SDH [§] [%]	51 \pm 11	38 \pm 8 \downarrow (n=19)	32 \downarrow^{\S}	33 \downarrow^{\S}	43	-25 %
Heteroplasmie	0	50 \pm 17	69	66	62	Nicht definiert
Deletionsgröße	0	4,7 \pm 1,5	9	5,9	2,6	Nicht definiert

Für diese Untersuchungen wurden nur Patienten mit genetisch gesicherten singulären Deletionen ausgewählt. Die Heteroplasmiegrade lagen zwischen 31 und 94 %. Schwerwiegende Veränderungen waren nachweisbar. So nahm der Gehalt an Mitochondrien, gemessen mit der Citratsynthase, um 100 % zu. Die hohe Standardabweichung (129 ± 74 U/g NCP) weist jedoch darauf hin, dass beträchtliche individuelle Schwankungen vorlagen. So gab es Patienten mit Deletionen in gleicher Heteroplasmie, deren Mitochondriengehalt normal, bzw. auf das 2 bis 3 fache erhöht war. Deshalb müssen die mitochondrialen Parameter auf die Citratsynthaseaktivität normiert werden. Dazu wurden die Enzymaktivitäten in Prozent der Citratsynthaseaktivität der gleichen Biopsie angegeben. Die Pyruvatatmung ($\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mgGewebe}$) wurde dagegen direkt auf die Citratsynthaseaktivität bezogen ($\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{U CS}$). Durch diese Normierungen (Gellerich, et al, 2003) werden die Deletions-bedingten Veränderungen an den Mitochondrien der CPEO-Patienten deutlich erkennbar. Die relativen Aktivitäten der Komplexe I, I+III, II+III, III und der Cytochromoxidase nahmen um 40 bis 60 % ab. Dagegen verminderte sich die Aktivität der SDH nur um 25 %. Weiterhin zeigte es sich, daß die Quotienten der auf die Succinatatmung bezogenen Pyruvatatmung (SRPR) und der auf die Succinatoxidation bezogenen NADH Oxidationsaktivitäten um 20 % verkleinert waren. Die Cytochromoxidase und der Komplex I der Atmungskette sind Schlüsselenzyme der Atmungskette. Deshalb sollten die Auswirkungen von Deletionen auf die Aktivitäten dieser Enzyme und auf die Mitochondrienfunktion näher analysiert werden.

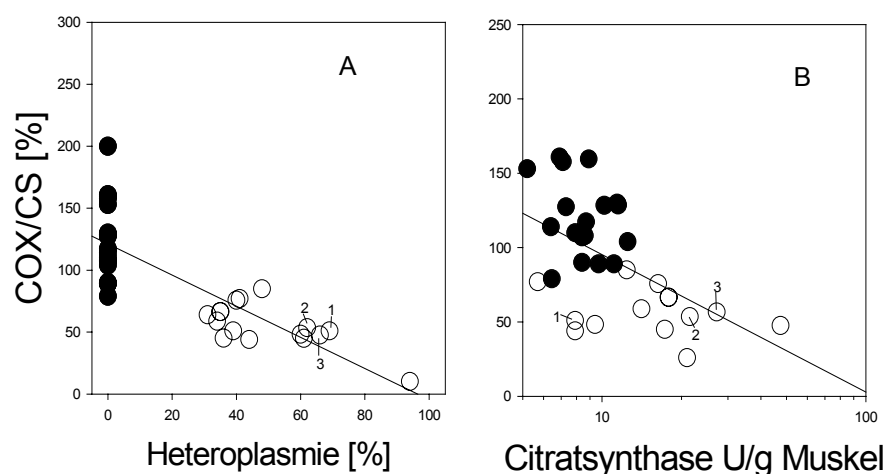


Abb. 7. Abhängigkeit der COX-Aktivität von der Heteroplasmie (A) und von der relativen Mitochondrienmenge (B) bei Gesunden (●) und CPEO-Patienten (○). Die COX-Aktivität wurde auf die Citratsynthaseaktivität normiert. Die Zahlen markieren die Meßwerte dreier Patienten mit unterschiedlicher Deletionsgröße und deshalb unterschiedlichen Ausfällen an den Protein-Genen (s. Tabelle 2).

In Abb. 7A wurde die normierte COX-Aktivität über der Heteroplasmie aufgetragen. Mit zunehmender Heteroplasmie nahm die COX-Aktivität ab. Der nach Pearson berechnete Korrelationskoeffizient betrug $r=0,81$, $P= 0.01$. Trotzdem fand sich eine Überlappung von Messpunkten, d.h. einige Messwerte der gesunden Kontrollen lagen niedriger als die höchsten Messwerte von CPEO-Patienten. Um die Variabilität des Mitochondriengehaltes in der Muskulatur von CPEO-Patienten zu verdeutlichen, wurden die normierten COX-Aktivitäten auch über der CS-Aktivität aufgetragen (Abb. 7B).

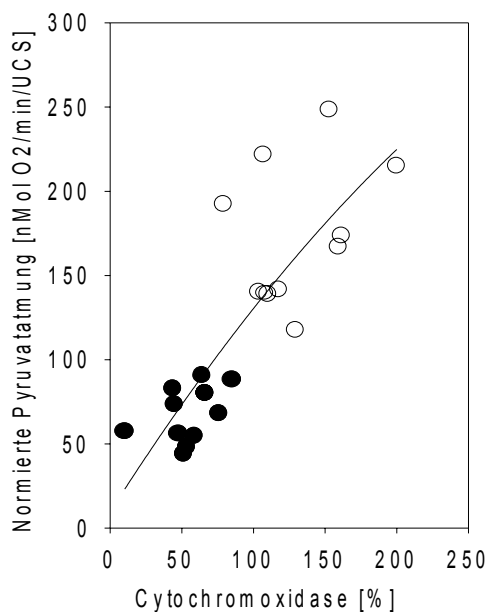


Abb. 8. Abhängigkeit der maximalen Pyruvatatmung von der Cytochromoxidaseaktivität. Die Pyruvat-abhängige state-3-Atmung wurde respirometrisch in permeabilisierten Muskelfasern gemessen, wie in Methoden beschrieben. Die Cytochromoxidaseaktivität wurde photometrisch in den entsprechenden Muskelhomogenaten bestimmt und auf die Citratsynthaseaktivität normiert. Gesunde Kontrollen (○) CPEO-Patienten (●). Der nach Pearson berechnete Korrelationskoeffizient betrug $r = 0.812$, $P = 0.0000026$ ($n = 23$)

Tabelle 2 enthält auch die Meßwerte dreier Patienten mit gleichem Heteroplasmiegrad aber stark unterschiedlicher Deletionsgröße. Auch in Abb.7A wurden die COX-Meßwerte dieser Patienten mit angegeben. Obwohl bei Patient 3 kein COX-Gen deletiert war, hatte dieser Patient eine um 50 % verminderte COX-Aktivität, wie bei den beiden Patienten mit deletierten COX-Genen. Auch hatten die Patienten 2 und 3 eine um 45 % verminderte Aktivität von Komplex III, obwohl bei beiden das Gen für Cytochrom b nicht betroffen war. Weiterhin fand sich keine Korrelation zwischen den Biochemischen Befunden und der Deletionsgröße (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß die Deletion der Protein-Gene ohne biologische Bedeutung ist was vermutlich darauf hinweist, daß die pathophysiologisch entscheidende Veränderung bei den von uns untersuchten Deletion das Fehlen der tRNA-Gene ist.

In der Skelettmuskulatur der CPEO Patienten fand sich eine stark vergrößerte Variabilität des Mitochondriengehaltes, der zwischen 3,7 und 47 U CS/g Muskel schwankte. Mit steigender CS-Aktivität nahm die relative COX-Aktivität signifikant ab. Es wird aber auch deutlich, dass es Patienten mit Deletionen gibt, die sowohl normale als auch erhöhte Mitochondriengehalte haben können.

Um die Abhängigkeit der Atmungsraten von der Cytochromoxidase-Aktivität zu analysieren, wurde beide Datensätze gegeneinander aufgetragen (Abb. 8). Die Datenpunkte der CPEO-Patienten und der gesunden Kontrollen waren klar voneinander getrennt. Es bestand eine positive Korrelation zwischen der aktiven Atmung und der Cytochromoxidaseaktivität ($r=0,812$, $p=0,0001$).

Dies war auch innerhalb der gesunden Kontrollwerte der Fall. Es fand sich also kein Bereich überschüssiger Cytochromoxidaseaktivität im Bereich maximaler Atmungsraten wie in Abb. 2 dargestellt.

Bei der Auftragung aller an den Mitochondrien der CPEO-Patienten gemessenen bioenergetischen Parameter (Abb.9) ergab sich, dass die Abnahme der Mitochondrienfunktion (maximale Pyruvat- und Succinatatmung) parallel zur Abnahme der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I, I+III, II+III, III und IV(COX) erfolgte und dass aber die Abnahme der SDH viel geringer ausfiel. Außerdem ist deutlich erkennbar, dass die Mitochondrienmenge mit dem Heteroplasmiegrad zunahm.

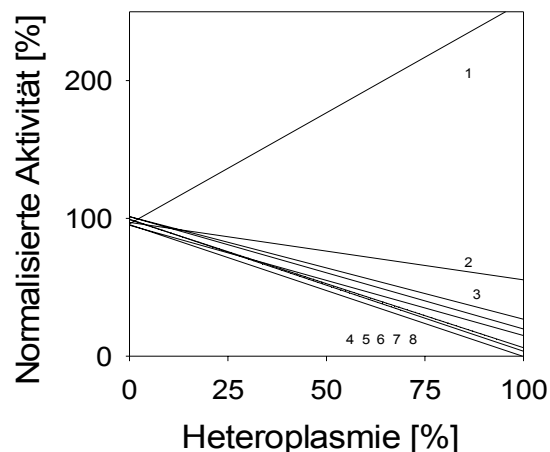


Abb. 9. Korrelation der Aktivitäten mitochondrialer Enzyme und der Mitochondrienfunktion mit der Heteroplasmie. Enzymaktivitäten und Atmungsraten wurden auf die entsprechenden Mittelwerte der Kontrollpatienten normiert (100%) und gegen die Heteroplasmie geplottet. Von oben nach unten: (1) Citratsynthase [U/g NCP], (2) SDH, (3) Succinat-abhängig Atmung (state 3/CS), (4) I+III/CS, (5) Pyruvatabhängig Atmung (state 3/CS), (6) COX/CS, (7) II+III/CS, (8) III/CS.

4.1.2 Untersuchung der Flusskontrolle der Cytochromoxidase und von Komplex I

Wie in der Einleitung ausgeführt, können Flusskontrollkoeffizienten mitochondrialer Enzyme auf die Atmungsgeschwindigkeit mit Hilfe von Inhibitor-titrations experimentell bestimmt werden. In Abb. 10 wurden typische Ergebnisse von Titrationsexperimenten an Muskelfasern eines Patienten ohne mitochondriale Erkrankung wiedergegeben.

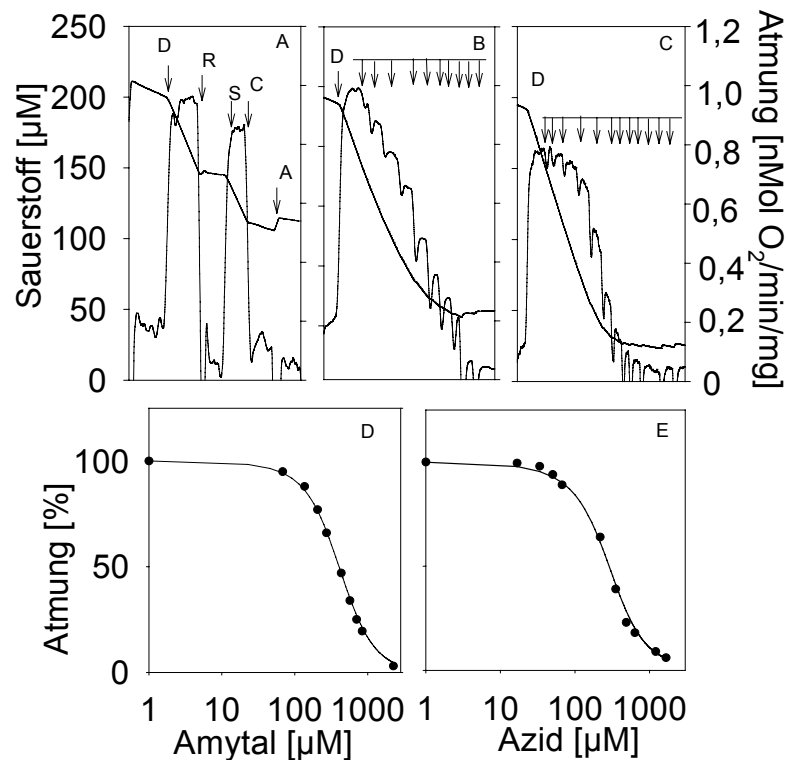


Abb. 10. Inhibitor-Titrations zur Quantifizierung der Mitochondrienfunktion aus der Muskelbiopsie eines gesunden Patienten. **A.** Multiple Substrat-Inhibitor Titration der aktiven Atmung von Skelettmuskelmitochondrien in permeabilisierten Muskelfasern wie in Methoden beschrieben. Die obere Linie beschreibt die Sauerstoffkonzentration im Oxygraphen (linke Ordinate), die untere Linie ist die erste Ableitung dieses Signals nach der Zeit (rechte Ordinate). Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch wurde in Gegenwart von 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat gemessen. Zugaben: F, 8 mg/ml Faser, D, 5 mM ADP; R, 20 µM Rotenon, S, 10 mM Succinat; C, 35 µM Carboxyatractylosid, A, 43 µM Antimyzin A. **B.** Zunehmende Hemmung state 3-Atmung (10 mM Pyruvat, 2 mM Malat, und 2 mM ADP) durch steigende Azidkonzentrationen. **C.** Hemmung der state 3 Atmung mit Amytal. Inkubationsbedingungen wie in Abbildung 10A. **D/E.** Auftragung der relativen Atmungsraten aus Abb. 10B/C gegen die entsprechenden Hemmstoffkonzentrationen und Berechnung der Flusskontrollkoeffizienten mittels Computerfitting durch nichtlineare Regression nach (Gellerich et al.,1990). Folgende Parameter wurden erhalten **10D:** $E_0 = 117 \mu\text{M}$; $K_d = 88,9 \mu\text{M}$ Amytal (fix); $J_0 = 100 \%$, $J_i = 0,36 \%$, $C_0 = 0,133$; $n = 1,76$; $r^2 = 0,997$. **10E:** $E_0 = 128 \mu\text{M}$; $K_d = 89 \mu\text{M}$ Azid (fix); $J_0 = 100 \%$, $J_i = 1,96 \%$, $C_0 = 0,26$; $n = 1,75$; $r^2 = 0,988$.

Zunächst wurde eine Multiple Substrat Inhibitor Titration durchgeführt, bei der die Komplex I-abhängige und die Komplex II-abhängige Atmung mit Pyruvat/Malat und mit

Succinat/Rotenon gemessen wurde (Abb. 10A). Die Untersuchung begann mit der Messung der endogenen Atmung in Gegenwart von 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat (State 2). Nach Zusatz von 5 mM ADP erhielt man die aktive Komplex I-abhängige Atmung (state 3). Rotenon hemmt den Komplex I der Atmungskette und die Atmung vermindert sich deshalb auch unter den Wert der endogenen Atmung. Nach erfolgter Rotenonhemmung kann die Succinatatmung gemessen werden, Rotenon verhindert die Umwandlung von Malat (einem Reaktionsprodukt der SDH) in Oxalacetat was die SDH hemmen würde. Durch Skalierung der Pyruvatatmung auf die Succinatatmung erhält man die „succinate related pyruvate respiration“ (SRPR). In Muskelfasern gesunder Patienten beträgt $SRPR = 117 \pm 15 \%$ (Tabelle 2). Die zur Erreichung maximaler Atmungsraten zugesetzte ADP-Menge ist so hoch, dass sie während der Messung praktisch nicht verbraucht wird. Deshalb muß zur Messung der Ruheatmung (state 4) der ADP-Transport in die Mitochondrien unterbunden werden, was durch Hemmung des AdN-Translokators mit Carboxyatractylosid geschehen kann. Die CAT-insensitive Atmung ist ein Maß für den nichtphosphorylierenden Sauerstoffverbrauch. Nach der Hemmung der Atmung

mit Antimycin A kann man den Sauerstoffverbrauch erfassen, der wahrscheinlich auf nichtenzymatische Umwandlung von Sauerstoff zu reaktivem Sauerstoff Spezies (ROS) zurückgeht. Die Differenz aus der Antimycin A resistenten und der CAT-resistenten Atmung ist ein direktes Maß für die Leakatmung. Die Abbildung 10 zeigt Respirogramme, die für gesunde Kontrollen typisch sind. In zwei weiteren Inkubationen wurden Inhibitortitrations mit Amytal (Komplex I) und Azid (COX) durchgeführt. Die auch während der Messung sichtbare Atmungsgeschwindigkeit (dünne Linie) erlaubt es festzustellen, wann stationäre Zustände erreicht worden sind. Erst danach darf die nächste Zugabe erfolgen. Die stationären Atmungsraten wurden über der Inhibitorkonzentration aufgetragen (Abb. 10B) und mit einem speziellen Computerprogramm ausgewertet, das bereits in 1.8 vorgestellt wurde.

Die Dissoziationskonstanten für die entsprechenden Hemmstoffe wurden bei der Fittung vorgegeben, nachdem aus vielen Einzelmessungen entsprechende Mittelwerte ermittelt worden waren. Die Abbildungen 10 E/F zeigen die gefitteten Titrationskurven mit den entsprechenden Ergebnissen. Für den Komplex I ergab sich ein Fluxkontrollkoeffizient von $Co_{Komplex\ I} = 0,13$ (s. Tabelle 3). Die Cytochromoxidase hatte einen etwas höheren Wert $Co_{COX} = 0,26$ (s. Tabelle 3).

Mit den in Abb. 10 beschriebenen Testprotokollen wurden Biopsien von 23 gesunden und 9 CPEO-Patienten untersucht. Abb. 11A zeigt das Respirogramm eines typischen CPEO-Patienten. Sowohl die Pyruvatabhängige state 3-Atmung als auch die SRPR waren deutlich vermindert. Wie die in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnisse aller Messungen zeigen, war

die auf CS bezogene Pyruvatatmung um 59 % vermindert. Die um 23 % verminderte SRPR weist auf einen Komplex I-abhängigen Defekt hin.

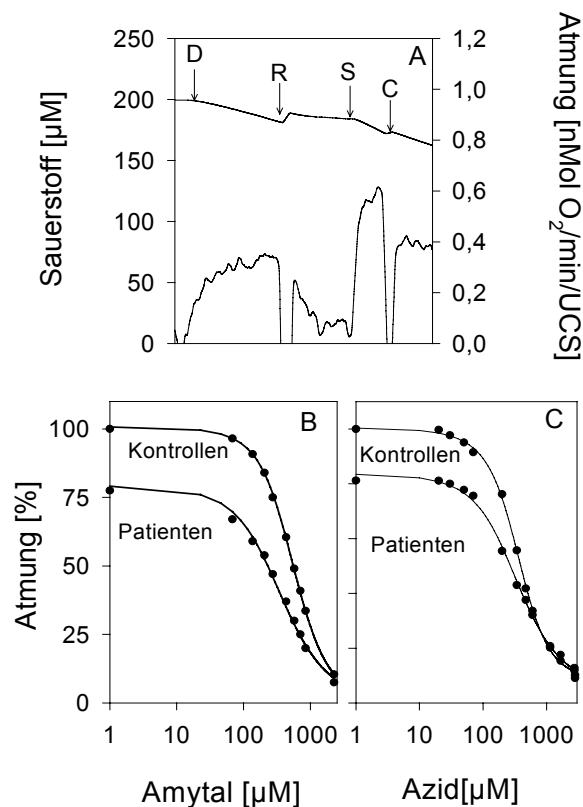


Abb. 11. Stark verminderte SRPR, abnehmende state 3-Atmung und ansteigende Flusskontrollkoeffizienten bei CPEO-Patienten mit single deletions. 11A, Typische multiple Substrat-Inhibitor Titration der aktiven Atmung von Skelettmuskelmitochondrien eines CPEO Patienten wie in Abb 10A beschrieben. **B,C**, Darstellung der durch nichtlineare Regression erhaltenen Fittingkurven von 7 bzw 9 CPEO-Patienten und 16 bzw 23 gesunden Kontrollen. Fittingparameter siehe Tabelle 3.

Die abnehmende Pyruvatatmung ist durch die um 46% verminderte Komplex I-Aktivität erklärbar, was sich auch in einer ansteigenden Flußkontrolle von Komplex I niederschlagen sollte. Auch die Aktivität der Cytochromoxidase war bei den CPEO-Patienten um 56 % vermindert (Tabelle 2). Auch diese beträchtliche Enzymverminderung sollte zu einem Anstieg von Co_{COX} führen. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden die Titrationskurven von 9 Deletionen und 23 gesunden Patienten gemeinsam ausgewertet. Wegen Materialmangels konnten die in Abb. 10 dargestellten Messungen von jedem Patienten jeweils nur einmal durchgeführt werden. Die dabei erhaltenen Titrationskurven wurden normiert, indem der Mittelwert der ungehemmten Atmung der gesunden Patienten gleich 100% gesetzt wurde. Die Mittelwerte der ungehemmten Atmungsraten der CPEO-Patienten betragen $80 \pm 9\%$ bzw. $82 \pm 6\%$ der ungehemmte Kontrollatmung (Abb. 11). Die Ergebnisse der Fittungen wurden in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Ansteigende Fluxkontrollkoeffizienten von Komplex I und COX für die state 3-Atmung von Mitochondrien aus Muskelbiopsien von CPEO-Patienten mit single deletions. Die Fittungsparameter der normierten Titrationskurven wurden durch nicht lineare Regression erhalten. Von den Titrationskurven der Kontrollen und der CPEO-Patienten wurden die ungehemmten Atmungsraten auf 100 % normiert ($J_o = 100\%$). Bei der zweiten Fittung wurden die Kurven der CPEO-Patienten auf $J_o = 80 \pm 9$ bzw 82 ± 6 % der ungehemmten Kontrollatmung normiert (Weitere Einzelheiten s. Text). Bei dieser Fittung fanden die Mittelwerte aller CPEO-Kurven Verwendung, weshalb es keine SD gibt. * : $P=0,003$; #: $P=0,00004$.

	Amytal			Azid		
	Kontrolle (n=23)	Deletion (n=7)		Kontrolle (n=16)	Deletion (n=9)	
		$J_o=100\%$	$J_o=80\%$		$J_o=100\%$	$J_o=82\%$
Kd	94±5	93±4	(94)	94±4	95±5	(94)
Co	0,11±0,02*	0,17±0,04*	(0,33)	0,23±0,07 [#]	0,32±0,05 [#]	(0,31)
Eo	127±23	109±8	(91)	141±28	124±24	(119)
Jo	101±1	100±1	(80)	100±2	101±2	(82)
Ji	3,61±5,22	1,60±2,23	(1,31)	6,37±3,01	8,82±4,90	(7,2)
n	1,62±0,11	1,43±0,22	(1,11)	1,52±0,18	1,40±0,25	(1,15)
r ²	0,99±0	0,99±0	(0,98)	0,99±0	0,99±0	(0,99)

Der Vergleich der CPEO-Kurven mit den Kontrollen erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen. Einmal wurden die ungehemmten Atmungsraten der Kontrollen und der CPEO Patienten jeweils als 100 % angenommen. Bei diesem Vergleich stieg $Co_{Komplex\ I}$ von 0,11 signifikant auf 0,17 an. Bei der zweiten Berechnung wurden die ungehemmten Atmungsraten der CPEO-Patienten als 80 bzw 82 % der ungehemmten Atmung der Kontrollen angenommen. Wird die verminderte Atmungsrate der CPEO-Patienten berücksichtigt (wie in Abb. 11 dargestellt) so steigt $Co_{Komplex\ I}$ sogar auf 0,33 an. Die Flusskontrolle stieg ebenfalls von $Co_{COX} = 0,23$ signifikant auf $Co_{COX} = 0,32$ und bei Berücksichtigung der Atmungsverminderung auf $Co_{COX} = 0,31$ an. Die Dissoziationskonstanten waren für diese Fittungen konstant gehalten worden. Die Variationskoeffizienten waren mit $r^2 = 0,99$ in allen Fällen sehr hoch.

4.2 Die Flusskontrolle in intakten Muskelzellen

Die Bestimmung von Fluxkontrollkoeffizienten mitochondrialer Enzyme in intakten Zellen ist ein bislang ungelöstes Problem. Es ist unklar, ob das zu untersuchende Enzym unter IN VIVO-

Bedingungen eine ähnliche Hemmbarkeit wie unter IN VITRO-Bedingungen hat. Weiterhin ist unklar ob, und wenn ja, in welcher Weise die Zellmembran die Zugänglichkeit des Hemmstoffes beeinflusst. Zur Klärung dieser Probleme wurden die Titrationskurven der Cytochromoxidase mit Cyanid unter verschiedenen metabolischen Bedingungen ermittelt und analysiert (Abb. 12). Zunächst untersuchten wir die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs der Cytochromoxidase in permeabilisierten Muskelfasern (intakte Mitochondrien) im Vergleich zu Muskelhomogenat (desintegrierte Mitochondrien). In Muskelfasern (Kreise in Abbildung 12A) bewirkten die ersten Cyanid-Zugaben nur eine geringe Abnahme der Atmungsgeschwindigkeit. Dementsprechend ergab sich ein C_{oCOX} von 0.19 bei einer $K_d = 2.7 \mu M$. Diese Dissoziationskonstante ergab sich als Mittelwert von 20 Einzelmessungen. Da angenommen werden kann, dass die K_d bei verschiedenen metabolischen Zuständen gleich sein sollte, wurde diese Konstante bei der Fittung der Parameter als konstant vorgegeben.

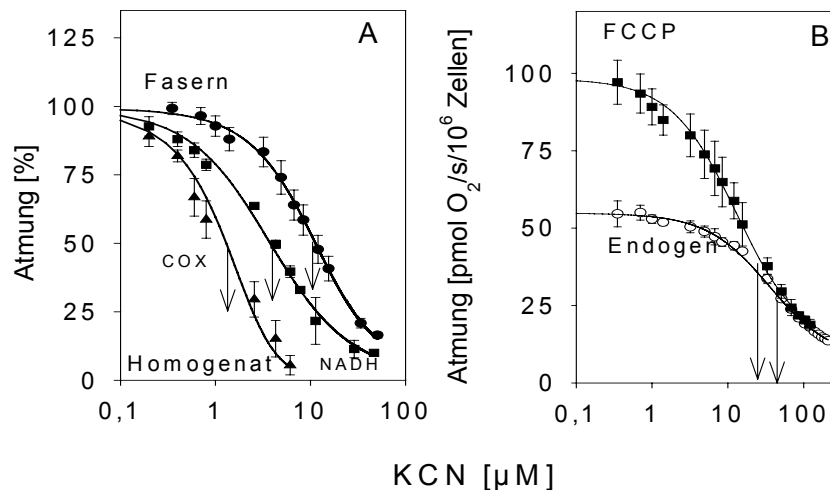


Abb.12. Bei Untersuchungen an intakten Zellen steigt die scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) an. **A:** Inhibitortitrationskurven des Sauerstoffverbrauchs von intakten Muskelmitochondrien in skinned fibers (Volle Kreise; Inkubationsbedingungen wie in Abb. 10 C und 11C, nur mit Verwendung von Cyanid anstelle von Azid und von Succinat/Rotenon anstelle von Pyruvat/Malat) und von desintegrierten Mitochondrien in Muskelhomogenat (Quadrate, mit 1,3 mM NADH als Substrat, Dreiecke mit 6,7 mM Ascorbat, 133 μM TMPD und 30 μM Cytochrom c als Substraten). **B:** Inhibitortitration der endogenen und der mit 0,7 μM FCCP entkoppelten Atmung in intakten humanen Myoblasten. Dazu wurden die Zellen wie in Methoden beschrieben kultiviert und in Inkubationsmedium inkubiert. Die Pfeile markieren die jeweiligen I_{50} -Werte. Gefittete C_{oCOX} s. Tabelle 6.

Im Muskelhomogenat (Quadrate in Abb. 12A) wurde die Oxidation von NADH respirometrisch gemessen, d.h. es wurde nur der Fluß durch die Komplexe I, III und IV erfasst. Es wird erkennbar, dass bereits die ersten Cyanidzugaben stärkere Abnahmen der Atmungsgeschwindigkeit bewirkten als bei den Muskelfasern. Dementsprechend ergaben sich auch deutlich höhere C_{oCOX} von 0.74 für die Oxidation von NADH. Bei Verwendung von reduziertem Cytochrom c als Substrat erfasst man nur den Fluß durch die COX, der demnach

mit der Enzymaktivität der COX identisch ist. Demzufolge wirken sich hier die Hemmstoffzugaben auch am stärksten aus.

Die Abbildung 12A beinhaltet noch einen weiteren interessanten Aspekt, der für die Angabe von I_{50} -Werten, also von Hemmstoffkonzentrationen, die zu einer 50 %-igen Hemmung führen, von Bedeutung ist. Diese Werte sind für die drei Titrationskurven sehr unterschiedlich. Der geringste Wert ($I_{50} = \text{ca. } 1,5 \mu\text{M}$) ergab sich bei der Titration der Cytochromoxidase mit zugesetztem Cytochrom c als Substrat, d.h. hier wurde das Enzym als allein gemessen (totale Kontrolle der Umsatzgeschwindigkeit durch die Cytochromoxidase). Bei der Verwendung von NADH als Substrat erfasst man dagegen die Atmungskettenenzyme I, III und IV. Unter diesen Bedingungen ist die C_{COX} für den gesamten Fluß geringer als 1 ($C_{\text{COX}} = 0.74$) und es wird eine stärkere Hemmung der COX benötigt um dem gesamten Fluß um 50 % zu hemmen ($I_{50} = 3 \mu\text{M KCN}$). In intakten Mitochondrien hängt der Fluß durch die Atmungskette jedoch von vielen weiteren Enzymen ab. Die C_{COX} ist deshalb weiter vermindert ($C_0 = 0.19$) und es muß noch mehr Enzym gehemmt werden, um den Fluß auf 50 % zu vermindern ($I_{50} = \text{ca. } 20 \mu\text{M}$). In Wirklichkeit ist aber die Wechselwirkung der COX mit Cyanid in allen drei metabolischen Systemen gleich, d.h. die K_d ist für die drei verschiedenen Zustände gleich. Es galt nun herauszufinden, ob bei Untersuchungen an intakten Zellen ebenfalls mit dieser K_d gerechnet werden kann.

Abb. 12 B zeigt die gefitteten Titrationskurven an intakten menschlichen Myoblasten für die endogene unbeeinflusste und die mit $0,7 \mu\text{M FCCP}$ entkoppelte Zellatmung. Für beide Kurven war mit einer K_d zwischen $2,6$ und $3 \mu\text{M KCN}$ keine Lösung möglich. Erst bei einer höheren scheinbaren K_d von 12 - $15 \mu\text{M KCN}$ waren hinreichend akzeptable Ergebnisse zu erhalten. Bezüglich der endogenen Atmung fand sich $C_{\text{COX}} = 0,32$ der bei Entkopplung auf $C_{\text{COX}} = 0,83$ anstieg. Beide Ergebnisse wurden für ähnliche scheinbare K_d von 12 bis $13,8 \mu\text{M KCN}$ erhalten, obwohl unterschiedliche metabolische Bedingungen und deutlich unterschiedliche C_0 vorlagen.

Als Ursache für die höheren scheinbaren Dissoziationskonstanten in intakten Zellen könnten potentialabhängige Konzentrationsgradienten um die Zellmembran in Betracht gezogen werden. Wenn diese Erklärung richtig ist, so müsste die scheinbare K_d für Azid an intakten Zellen ebenfalls höher sein. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Azid Titrationskurven der Cytochromoxidase unter ähnlichen Bedingungen gemessen, wie die mit Cyanid (Abb. 13). Abbildung 13A zeigt Azid-Titrationskurven, die an menschlichen Muskelfasern und an Muskelhomogenat erhalten wurden. Beide Kurven ergaben mit $89 \mu\text{M Azid}$ optimale Fits. Während die C_{COX} in den intakten Mitochondrien $0,23$ betrug, wurde im Homogenat $C_{\text{COX}} = 0,99$ gemessen.

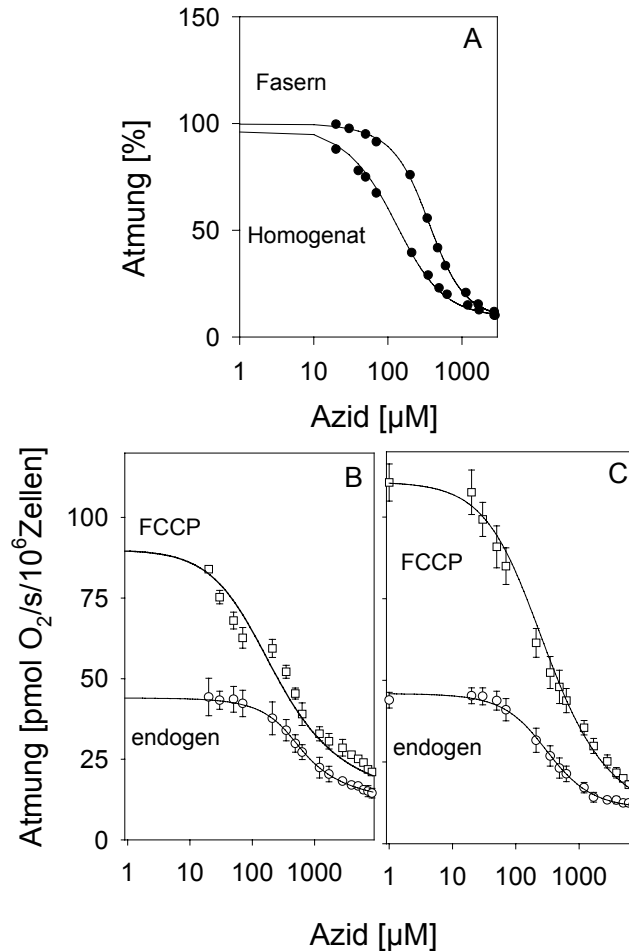


Abb.13. Anstieg der scheinbaren K_d für Azid in humanen Myoblasten und glatten Gefäßmuskelzellen gegenüber humanen Muskelfasern und Muskelhomogenaten. A: Inhibitortitrationskurven des Sauerstoffverbrauchs von intakten Muskelmitochondrien in skinned fibers (Fasern: Inkubationsbedingungen wie in Abb. 10 C; Homogenat Inkubation mit 6,7 mM Ascorbat, 133 μM TMPD und 30 μM Cytochrom c als Substraten gemessener isolierter Schritt. Die nichtlineare Regression ergab folgenden Parameter: Fasern: $C_o = 0,21$, $K_d = 89 \mu\text{M}$ Azid; COX (isolierter Schritt) $C_o = 0,99$, $K_d = 89 \mu\text{M}$ Azid. **B,C:** Inhibitortitration der endogenen und der mit 0,7 μM FCCP entkoppelten Atmung in intakten humanen Myoblasten (B) und in humanen glatten Gefäßmuskelzellen. Dazu wurden die Zellen wie in Methoden beschrieben kultiviert und in Inkubationsmedium inkubiert. Gefittete $C_{o\text{COX}}$ s. Tabelle 6.

In Myoblasten und in glatten Gefäßmuskelzellen wurden die besten Fits jedoch mit 160 μM Azid erreicht. Die $C_{o\text{COX}}$ für die endogene Atmung betrug 0,32 in Myoblasten und 0,30 in glatten Gefäßmuskelzellen. Unter entkoppelten Bedingungen stieg $C_{o\text{COX}}$ auf 0,87 bzw 0,80 an. Demnach sind die K_d auch für Azid in intakten menschlichen Muskelzellen (Myoblasten und Gefäßmuskelzellen) fast um den Faktor zwei höher als in Systemen ohne Zellmembranen. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, dass die Zellmembran geladen ist und deshalb die Akkumulation der negativ geladenen Ionen Azid und Cyanid beeinflusst. Man müßte also bei diesen an intakten Zellen ermittelten Konstanten von scheinbaren Dissoziationskonstanten

sprechen, da sie noch von der Zugänglichkeit der Mitochondrien für die Hemmstoffe abhängen.

4.3 Einfluß der „common deletion“ auf die funktionellen Eigenschaften von Mitochondrien in Cybrids

Wegen der schon erwähnten sehr begrenzten Verfügbarkeit sind verlässliche Kontrollstärkeuntersuchungen an Patientenmaterial nur in sehr begrenztem Maße möglich. Deshalb untersuchten wir in Kooperation mit Prof. Wai aus Tapei Cybrids mit „common deletion“ im Vergleich zum Wildtyp dieser Zellen. Abbildung 14A zeigt die respiratorischen Eigenschaften der Wildtyp-Cybrids. Ohne weitere Zusätze wurde zunächst die endogene Atmung gemessen. Diese war mit $25 \text{ pmol O}_2/\text{s}/10^6$ Zellen ähnlich wie in Cybrids mit „common deletion“ ($25,2 \text{ pmol O}_2/\text{s}/10^6$ Zellen).

Tabelle 4
Glukosetitrations von Cybrids mit „common deletion“ in 47%iger Heteroplasmie im Vergleich zum Wildtyp. Atmungsrate: Mittelwert \pm SD; n = Anzahl der Experimente; *: $P < 0,05$ im Vergleich zwischen Wildtyp und Zellen mit Deletionen

	Wildtyp (n=4)	47% Deletion (n=4)
Endoge Atmung	100	100
Glukose (25mM)	61 \pm 11	60 \pm 6
Glukose (37mM)	72 \pm 15	51 \pm 4*
Glukose (41mM)	n.d.	48 \pm 6

Nach Zusatz von 25 mM Glucose verminderte sich die Atmungsgeschwindigkeit auf $18 \text{ pmol O}_2/\text{s}/10^6$ Zellen. Diese alt bekannte Erscheinung wird als CRABTREE-Effekt bezeichnet (Zum Mechanismus dieses Effektes s. Diskussion). Abb. 14B zeigt, daß der CRABTREE-Effekt in Zellen mit „common deletion“ konzentrationsabhängig war. In Tabelle 4 wird dargestellt, daß das Ausmaß des CRABTREE-Effektes in Zellen mit „single deletions“ größer war als in den Wildtypzellen. Die Abhängigkeit der entkoppelten Atmungsgeschwindigkeit in Cybrids von der Entkopplerkonzentration wurde in Abb. 15 dargestellt.

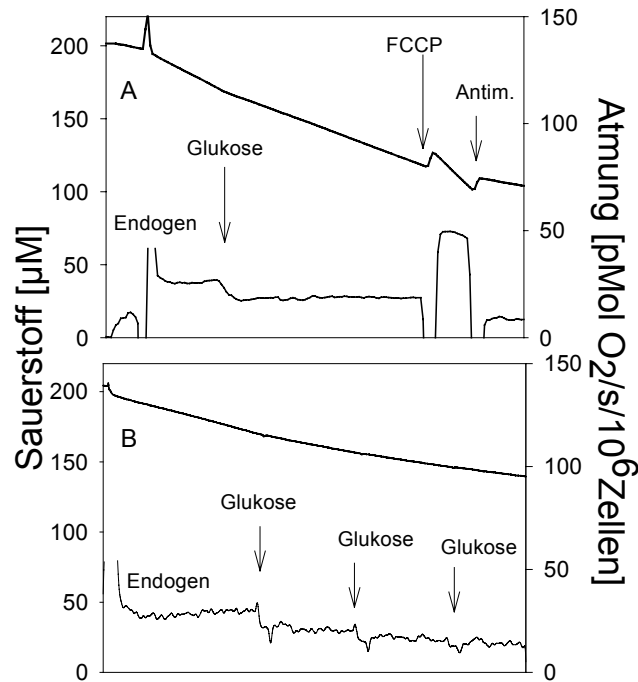


Abb.14. Abhängigkeit des CRABTREE-Effektes in Cybrids mit „common deletion“ von der Glukosekonzentration. A. Nach der Messung der endogenen Atmung in Inkubationmedium wurden 25 mM Glukose, 0,7 mM FCCP und 43 μM Antimycin A zugegeben. B. Zunehmende Hemmung der endogenen Atmung durch steigende Glukosekonzentrationen (25 mM, 37 mM und 41 mM Glukose).

In Wildtyp-Cybrids stieg die Atmungsrate mit den Zugaben an. Das Maximum wurde bei 1,02 μM FCCP erreicht, danach verminderten sich die Atmungsraten. In Cybrids mit „common deletion“ war das Maximum bereits bei 0,68 μM FCCP erreicht auch das Ausmaß der Atmungssteigerung war um 13 % geringer.

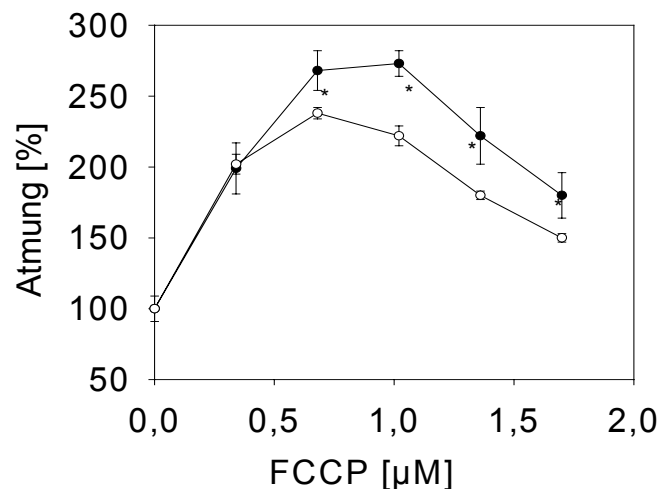


Abb. 15. Abhängigkeit der entkoppelten Atmungsgeschwindigkeit in Cybrids von der Entkopplerkonzentration. Dazu wurden die Zellen wie in Methoden beschrieben kultiviert und in Inkubationsmedium inkubiert. (●) : Wildtyp; (○): 47 %- Deletion. * : signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen Wildtyp und 47 %-Deletion.

In den Cybrids wurden ebenfalls die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe bestimmt. In Tabelle 5 wurde der Einfluß der „common deletion“ auf die bioenergetischen Eigenschaften der Cybrid-Mitochondrien als Änderung gegenüber den Wildtypzellen dargestellt

Tabelle 5

Spezifische Aktivitäten der mitochondrialen Enzyme im Zellhomogenat von Cybrids mit „common deletion“ in 47 %iger Heteroplasmie im Vergleich zum Wildtyp. Enzymaktivität in mU/10⁶ Zellen als Mittelwert ± SD; n= Anzahl der Experiment; Veränderung = [Spalte (47%-Deletion) – Spalte (Wild Typ)]100; * signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen Wild Typ und 47%-Deletion.

	Wildtyp	%CS	47%-Deletion	%CS	Veränderung
Atmung _{Endogen}	25,0±2 (n=4)		25,2±1 (n=4)		+0,8%
Atmung _{FCCP}	273±10 (n=4)		238±7 (n=4)		-13%*
CS	12±1 (n=10)	100	11±0 (n=10)	100	-5%
SDH	2,44±0,22 (n=6)	21	2,36±0,12 (n=3)	21	-3%
Komplex I	1,19±0,47 (n=14)	10	0,76±0,32 (n=13)	7	-36%*
Komplex III	2,64±0,53 (n=7)	23	1,15±0,22 (n=5)	10	-56%*
Komplex I+III	0,70±0,28 (n=10)	6	0,33±0,07 (n=6)	3	-53%*
Komplex II+III	0,65±0,20 (n=8)	6	0,34±0,07 (n=3)	3	-48%*
COX	1,99±0,21 (n=4)	17	1,45±0,51 (n=4)	13	-27%*

Während sich die Mitochondrienmenge praktisch nicht änderte, nahmen die Aktivitäten der Komplexe I, I+III, II+ III, III und die der Cytochromoxidase um 27 bis 56 % ab. Die SDH-Aktivität änderte sich praktisch nicht. Trotzdem blieb die endogene Atmungsgeschwindigkeit praktisch unverändert. Dagegen war die maximal entkoppelte Atmung der Deletions-Cybrids um 13 % vermindert.

4.4 Abhängigkeit der Flusskontrolle der Cytochromoxidase in Cybrids und in humanen Myoblasten vom metabolischen Zustand und von der „common deletion“

In Abbildung 16A wurden Cyanidtitrationen der Atmungsgeschwindigkeit von Wildtyp-Cybrids als Mittelwert von 6-8 Experimenten dargestellt. Unter endogenen Bedingungen ergab sich mit $Co_{COX} = 0,31$, ein Wert der deutlich über dem an permeabilisierten Fasern von normalen Patienten bestimmtem Wert ($Co_{COX} = 0,23$) lag. Für die Glucose-abhängige

Atmung wurde eine erhöhte Flußkontrolle ($Co_{COX} = 0,42$) ermittelt. Noch höher lag die Kontrolle der entkoppelten Atmung ($Co_{COX} = 0,74$).

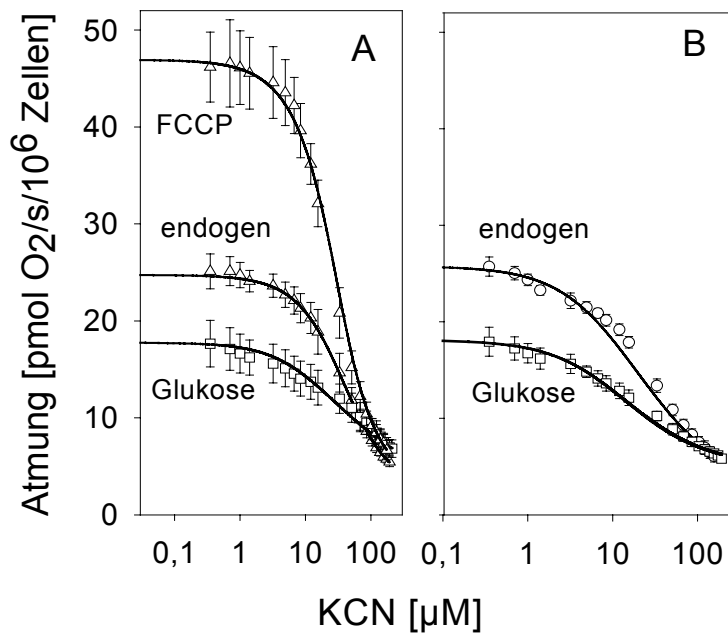


Abb.16 Cyanid-Titration bei verschiedenen metabolischen Zuständen von Cybrids. A. Inhibitortitrationskurven der endogenen Atmung, der Atmung in Gegenwart von 25 mM Glukose und der mit 0,7 µM FCCP entkoppelten Atmung in Wildtyp-Cybrids. **B.** Inhibitortitrationskurven der endogenen und der Glukose-abhängigen Atmung in Cybrids mit „common deletion“. Dazu wurden die Zellen wie in Methoden beschrieben kultiviert und in Inkubationsmedium inkubiert. Gefittete Co_{COX} s. Tabelle 6.

In Cybrids mit „common deletion“ (Abb 16B) stieg die Co_{COX} von 0,31 auf 0,59 an. Auch die Kontrolle der Glucose-abhängigen Atmung stieg von $Co_{COX} = 0,42$ deutlich auf $Co_{COX} = 0,72$ an.

In Abbildung 17B wurde der Einfluß der „common deletion“ auf den Schwellenwert der Cytochromoxidase-Hemmung dargestellt. Dazu wurde die Cyanid-Hemmung der Zellatmung über der Cyanid-Hemmung der enzymatisch bestimmten Aktivität der Cytochromoxidase aufgetragen (Daten aus Abb. 17A). Dabei ergibt sich, dass die COX in Wildtyp-Cybrids bis zu 37 % gehemmt werden kann, ohne dass sich die Zellatmung nennenswert vermindert. In Cybrids mit „common deletion“ wurde die Zellatmung schon bei deutlich geringerer Enzymhemmung (ca. 15 %) vermindert.

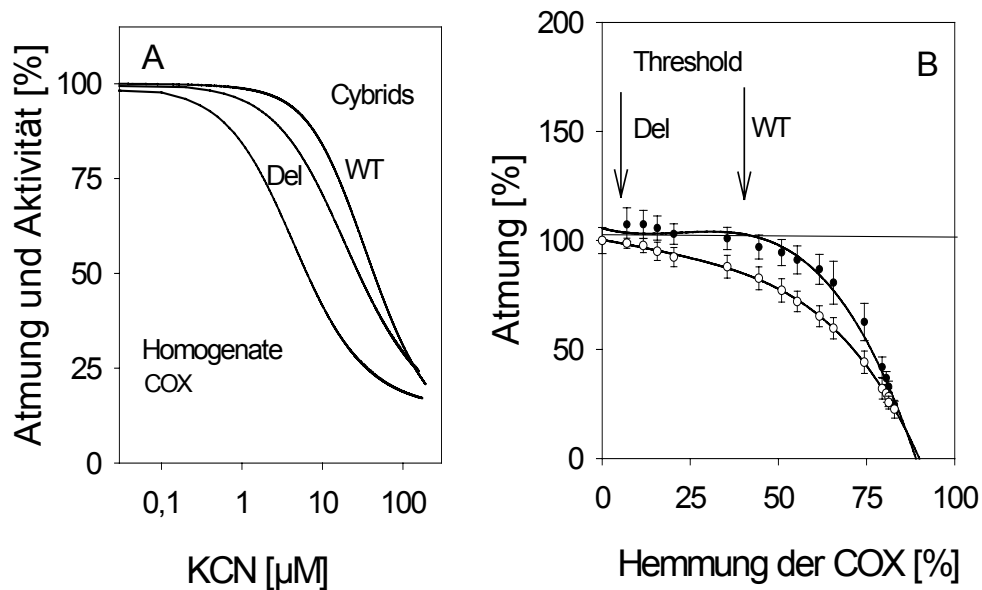


Abb.17. Cyanid-Titration der endogenen Atmung von Cybrids mit "common deletion" im Vergleich zu Kontroll-Cybrids und der COX als isoliertem Schritt sowie der daraus resultierendem Tresholdplot. A. Inhibitortitration der endogenen Atmung in intakten Cybrids (WT, Wildtyp-Cybrids; Del, Cybrids mit "common deletion") und der COX Aktivitäten im Zellhomogenat (Homogenat, COX). Dazu wurden die Zellen wie in Methoden beschrieben kultiviert und in Inkubationsmedium inkubiert. Die COX Aktivität wurde wie in Methoden beschrieben spektralphotometrisch gemessen. **B.** Die Cyanid-Hemmung der Zellatmung wurde über der Cyanid-Hemmung der enzymatisch bestimmten Aktivität der COX auf getragen.

In Tabelle 6 wurden die an verschiedenen Zelltypen bestimmten Flusskontrollkoeffizienten der COX zusammengefaßt. Teilweise wurden die Messungen sowohl mit Cyanid als auch mit Azid unter den gleichen Bedingungen ausgeführt. Bei menschlichen Myoblasten waren die mit beiden Hemmstoffen erhaltenen Co_{COX} -Werte gleich. Im Falle der menschlichen Gefäßmuskelzellen waren die mit Cyanid bestimmten Werte mit $Co_{COX} = 0,25$ um 17 % geringer als die mit Azid bestimmten Werte. Die Co_{COX} für die endogene Atmung war in den zwei humanen Muskelzelllinien ähnlich wie in den Cybrids ($Co_{COX} = 0,25-0,32$). In Gegenwart von FCCP stieg in allen Zelllinien die Co_{COX} stark an ($Co_{COX} = 0,74-0,88$). Ebenso stieg, wie schon erwähnt, die Co_{COX} in Cybrids mit „common deletion“ stark an.

Tabelle 6
Flusskontrollkoeffizienten der COX in unterschiedlichen Zelltypen bei verschiedenen metabolischen Zuständen

	Endogen KCN Azid	Glukose KCN	0,7 μ M FCCP KCN Azid	1,7 μ M FCCP KCN
Glatte Gefäßmuskel Zellen	0,25 0,30	n.d.	0,88 0,80	0,96
Myoblasten	0,32 0,32	n.d.	0,83 0,87	n.d.
Cybridzellen (Wildtyp)	0,31 n.d.	0,42 n.d.	0,74 n.d.	n.d.
Cybridzellen (com.del. 47%)	0,59 n.d.	0,72 n.d.	0,75 n.d.	n.d.

5 Diskussion

5.1 Auswirkungen von Deletionen in der mt-DNA auf die Eigenschaften von Muskelmitochondrien

Trotz des gesicherten Zusammenhangs zwischen Deletionen der mtDNA und dem klinischen Bild der CPEO sind die Beziehungen zwischen Genotyp und Phenotyp nach wie vor rätselhaft (Morgan-Hughes 1999). So kann es sein, dass man in Muskelbiopsien von gesicherten CPEO Patienten Mitochondrien mit scheinbar normalen funktionellen und enzymatischen Eigenschaften finden kann (Gellerich et al, 2002). Manchmal findet man auch bei Patienten ohne mitochondrialen Erkrankungen stärkere Veränderungen der Mitochondrienfunktion und der Enzymmuster als bei Patienten mit gesicherten mitochondrialen Defekten. Zwei Ursachen können hierfür als Erklärung herangezogen werden. Der wichtigste Grund liegt in der Komplexität der Mitochondrienfunktion, die durch viele akute Ereignisse wie Sepsis, Ischämie und Intoxikationen (Gifte, Medikamente) gestört werden kann (Gellerich et al., 2003). Ein weiterer Grund liegt in der hohen Zahl der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Proteine (über 180), deren Genom routinemäßig z.Z. noch nicht vollständig untersucht werden kann. Ein weiteres Problem erwächst aus der großen Variabilität der Mitochondrienmenge in der Skelettmuskulatur (Gellerich et al., 2003). Außerdem ist bekannt, dass sich hereditäre mitochondriale Defekte nicht homogen, sondern mosaikförmig über die untersuchten Fasern verteilen, und dass es auch innerhalb von einzelnen Fasern zu starken Inhomogenitäten mit normalen und veränderten Regionen kommt. So ist es verständlich, daß bei der Untersuchung von Muskelbiopsien mit beträchtlichen Schwankungsbreiten zu rechnen ist.

Die Frage, in wie weit diese unbestrittene morphologische Heterogenität zur Erklärung für heterogene Messergebnisse herangezogen werden kann ist nicht klar zu beantworten, denn auch die Untersuchungsmethoden sind mit beträchtlichen Fehlermöglichkeiten behaftet und standardisierte Protokolle fehlen (Gellerich et al., 2004).

Eine große Verbesserung wird durch die Normierung der bioenergetischen Parameter auf den Mitochondriengehalt, erreicht. Dies kann durch den Bezug auf die Aktivität der Citratsynthase geschehen. Von diesem Enzym ist bekannt, dass es streng mit dem Mitochondriengehalt korreliert (Schwerzmann et al., 1989). Auch gibt es bislang keine Berichte über pathologische Änderungen der CS-Aktivität.

5.2 Schwellenwerte für funktionelle Konsequenzen verminderter Enzymaktivitäten

Die Frage, wie weit eine Enzymaktivität vermindert sein muß, um funktionelle Ausfälle zu verursachen, ist schwierig zu beantworten. Wenn man davon ausgeht, dass während der Evolution Enzymaktivitäten so angelegt wurden, dass kleinere Enzymverminderungen keine schwerwiegenden Defekte verursachen, so sollten die Enzyme in überschüssiger Kapazität vorhanden sein. Andererseits sind seit langem sogenannte Schrittmacherenzyme bekannt (z.B. Hexokinase für die Glycolyse), bei denen die Aktivität eines Stoffwechselweges über die regulierbare Aktivität des Schrittmacherenzymes gesteuert wird (Newsholme et al., 1965). Dieses Schrittmacherenzymkonzept wurde jedoch inzwischen von dem Flusskontrollkonzept abgelöst, wonach sich alle Enzyme des metabolischen Systems die Kontrolle über den Fluß teilen (metabolische Demokratie) und die Dominanz eines einzelnen Enzyms (metabolischer Diktator) entfällt (Kacser und Burns 1979; Flint et al., 1980). Mit Flusskontrollkoeffizienten kann man den Zusammenhang zwischen individueller Enzymaktivität und metabolischem Fluss präzise beschreiben (Heinrich und Rapoport 1974; Kacser und Burns 1979). Der Beitrag der einzelnen Enzyme zur Kontrolle des Stoffwechselweges kann durch das Kontrollstärkemuster beschrieben werden, das in Abhängigkeit von der Systemgröße (Gellerich et al., 1983), der Flußgeschwindigkeit und anderer Einflüsse grundsätzlich variabel ist (Brown 1995). In Anbetracht dieser Komplexität kann es auch keine für alle Enzyme verbindliche Definition eines Schwellenwertes geben. Trotzdem gibt es viele Arbeiten, die bei mitochondrialen Enzymdefekten von einem Schwellenwert bei 60 % ausgehen (Letellier et al., 1993; Mazat et al., 1997). Richtiger wäre es aber, dieses Problem für jedes betroffene Enzym separat zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Deletionen der mtDNA auf die Aktivität der Atmungskettenkomplexe und der Mitochondrienfunktion untersucht. Nach Normierung der Atmungsgeschwindigkeiten und der Enzymaktivitäten auf den Mitochondriengehalt konnte gezeigt werden, dass die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe mit zunehmender Heteroplasmie linear abnehmen. Dabei ist das Ausmaß der Abnahme der Atmungskettenkomplexe I, I+III, II+III, III und der COX gleich. Interessanterweise nimmt die aktive Pyruvatatmung in gleichem Maße ab, wie die Aktivitäten der Atmungskettenenzyme. Einmal steht diese Parallelität in völligem Gegensatz zu dem in Abbildung 2 beschriebenen theoretischen Zusammenhang zwischen Funktion und der Enzymaktivität. Nach dieser Abbildung sollte es Bereiche geben, in denen die Enzymaktivität vermindert werden kann, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Funktion kommt. Außerdem muß wegen der Aufteilung der Kontrolle unter allen Enzymen des Systems die

Verminderung der Enzymaktivität stärker sein, als die dadurch bewirkte Funktionsverminderung. Abb. 2 bezieht sich jedoch auf die Änderung einer Enzymaktivität innerhalb des ansonsten konstant bleibenden metabolischen Systems. Bei den CPEO-Patienten mit Deletionen vom Typ der „common deletion“ aber sind alle 4 Atmungskettenkomplexe, die mitochondrial kodierte Untereinheiten enthalten, gleichzeitig betroffen.

Die Erhöhung einer einzelnen Enzymaktivität über ihren optimalen Wert hinaus, sollte keine Erhöhung des metabolischen Flusses mehr verursachen dürfen. Unklar ist jedoch, ob sich die Natur solche Überschusskapazitäten überhaupt leisten kann. Sicherlich nicht in jedem Fall. Es gibt aber Enzyme, die wirklich in großem Überschuß vorliegen, z.B. die zytosolische Kreatinkinase, die wohl in fast jeder metabolischen Situation ihre Reaktionspartner ins Gleichgewicht setzt (Veech et al., 1979). Solche Überschußbedingungen scheinen jedoch an der Atmungskette nicht vorzuliegen, weshalb der lineare Zusammenhang zwischen normierter Pyruvatatmung und COX-Aktivität (Abb. 8) die Situation in der Atmungskette wohl richtig widerspiegelt. Andererseits ist jedoch zu bedenken, dass sich beim Vorliegen von Deletionen nicht nur die COX allein, sondern auch die Aktivitäten aller anderen Atmungskettenkomplexe vermindern, so dass die COX-Aktivität hier nur als Maß für die gesamte Atmungskettenaktivität dient, mit deren Abnahme die maximale Atmung natürlich abnehmen muß. Die gleichsinnige und lineare Abnahme der Enzymaktivitäten und der Mitochondrienfunktion zeigt, dass es bei Deletions-bedingten Defekten wahrscheinlich keinen Schwellenwert gibt, der überschritten werden müsste, um nachweisbare Funktionsdefizite zu verursachen. Trotzdem kann man feststellen, dass der Heteroplasmiegrad wahrscheinlich bis zu 5 bis 10 % betragen sollte um nachweisbare Funktionsveränderungen zu verursachen (Gellerich et al., 2002).

Interessant wäre es, den Schwellenwert bei Mutationen in reinen Proteingenen zu untersuchen. Leider standen uns bislang nur einige Patienten mit entsprechenden Mutationen zur Verfügung. Bei Punktmutationen scheinen die Schwellenwerte aber tatsächlich bedeutend höher zu liegen. Bei Aktivitätsverminderungen einzelner Enzyme muß also mit dem Phänomen überschüssiger Enzymkapazitäten im Vergleich zum metabolischen System gerechnet werden. Da der Fluxkontrollkoeffizient eine Verbindung zwischen Eigenschaften individueller Enzyme und dem Fluß durch das metabolischen System herstellt, sollte die Bestimmung von Fluxkontrollkoeffizienten eine Möglichkeit sein, diese Änderungen zu quantifizieren.

5.3 Nicht die Gene der mitochondrial kodierten Proteine, sondern die Gene tRNA_L, tRNA_H, tRNA_S-Gene sind entscheidend für die metabolischen Konsequenzen bei Deletionen der mtDNA

Durch einen glücklichen Zufall waren in unserer CPEO-Patientengruppe drei Patienten mit fast gleichem Heteroplasmiegrad aber großen Unterschieden in der Deletionsgröße, so daß man bei diesen Patienten die Ausfälle in Abhängigkeit von den deletierten Genen studieren konnte. Der Patient 3 hatte die kleinste Deletion von 2.6 kB, die nur Proteingene des Komplexes I betrafen. Trotzdem waren bei diesem Patienten die Aktivitäten von Komplex III und IV in ähnlichem Ausmaß vermindert wie bei den Patienten 1 und 2 (Tabelle 2, Abb. 7). Ähnliches traf für Patient 2 in Bezug auf den Komplex III zu. Darüber hinaus ergab sich keinerlei Abhängigkeit zwischen der COX-Aktivität und der Deletionsgröße (Gellerich et al., 2002). Dagegen ergab der Plot der normierten Aktivitäten und Funktionen über dem Heteroplasmiegrad für alle Parameter signifikante Korrelationen (Abb. 9). Demnach korrelieren die Ausfälle mit *den* deletierten Genen die in *allen* Patienten zu finden waren. Das traf aber nur für die drei tRNA für Serin, Histidin und Leucin zu. Der Ausfall dieser tRNA wird bei der Synthese aller mitochondrialer Proteine zum Stop führen, wenn eine dieser in allen Proteinen häufig vorkommenden Aminosäuren eingebaut werden muß. Demnach ist es dann gleichgültig, ob die zu realisierenden Proteingene noch zusätzlich deletiert sind oder nicht. Sie können ohnehin nicht synthetisiert werden. Aus diesen Gründen ergab unsere Analyse, daß die biochemischen Auffälle bei Deletionen der mtDNA nicht mit der Deletionsgröße sondern nur mit der Heteroplasmie korrelieren. Es ist jedoch denkbar, daß es Deletionen der mtDNA gibt, die keine tRNA-Gene beinhalten. Solche Deletionen könnte man als reine „Protein-Gen-Deletionen“ bezeichnen. Deren Schädigungspotential müßte kleiner sein, als das der Deletionen vom „common-deletion“-Typ sein, weil nur die deletierten Proteine betroffen wären. Bei den von uns untersuchten Patienten gab es aber offensichtlich keine reinen „Protein-Gen-Deletionen“.

5.4 Indirekter Hinweis of oxidativen Stress

Bei unseren CPEO-Patienten mit „single deletions“ nahm auch die relative Aktivität von Komplex II ab (Tab. 2, Gellerich et al., 2002), obwohl dieser keine mitochondriale Untereinheit enthält. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der Komplex II durch oxidativen Streß geschädigt wird, der eine Folge des verminderten Sauerstoffverbrauchs wegen der

gestörten Mitochondrien sein könnte. Eine solche Möglichkeit wurde kürzlich von Rustin als wahrscheinlich diskutiert (Rustin et al., 2002).

5.5 Flusskontrolle von Komplex I und der COX auf die Pyruvatatmung in permeabilisierten Muskelfasern

Die Bestimmung von Flusskontrollkoeffizienten hat zwei wesentliche Aspekte: Einmal geht es um das Verständnis der Regulation der oxidativen Phosphorylierung bei mitochondrialen Muskelerkrankungen und zum zweiten geht es um einen quantifizierbaren Nachweis von Funktionsverlusten, die durch verminderte Enzymaktivitäten verursacht werden. Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Bestimmung von Flusskontrollkoeffizienten mittels Inhibitortitrationen wurde bereits 1983 (Gellerich et al., 1983; Gellerich et al., 1990) publiziert. Mit dieser Methode können alle Enzyme, für die es spezifische Hemmstoffe mit hinreichend hoher Affinität gibt, untersucht werden. Mittels Computerfitting lassen sich aus den Titrationskurven die Flusskontrollkoeffizienten der zu untersuchenden Enzyme berechnen (Gellerich et al., 1990). Neben diesen hat die Dissoziationskonstante einen wesentlichen Einfluß auf die Form der Titrationskurven (Gellerich et al., 1992). Um korrekte Ergebnisse zu erhalten, muß man zunächst an einem Zellhomogenat die Dissoziationskonstante experimentell bestimmen. Als K_d wurden für den Komplex I 94 μM Amytal und für die COX 95 μM Azid bzw. 3 μM CN ermittelt.

Bei Vorgabe dieser Dissoziationskonstanten konnten für Mitochondrien in „skinned fibers“ die $Co_{\text{Komplex I}} = 0.11 \pm 0.02$, und $Co_{\text{COX}} = 0.23 \pm 0,07$ bestimmt werden. Die Co_{COX} ist demnach etwa doppelt so hoch als die $Co_{\text{Komplex I}}$. Der Co_{COX} -Wert entspricht dem von Kunz in Muskelfasern bestimmten Wert ($Co_{\text{COX}} = 0,27 \pm 0,003$, Kunz et al., 2000). Rossignol R et al., fanden unter ähnlichen Bedingungen im Rattenmuskel ($Co_{\text{Komplex I}} = 0,13 \pm 0.03$, $Co_{\text{COX}} = 0,2 \pm 0.04$). Kunz konnte zeigen, dass die Co_{COX} von den state 3 Bedingungen abhängig ist (Kunz 2000) und das sich durch den Übergang vom Substratpaar Glutamat/Malat zu Glutamat/Succinat plus Malat die maximale Atmungsrate deutlich erhöht was zu einer Verminderung der Reservekapazität führt.

Bei Patienten mit „single deletions“ stieg die Flußkontrolle beider Enzyme signifikant an ($Co_{\text{Komplex I}} = 0,17 \pm 0,4$, $Co_{\text{COX}} = 0,32 \pm 0,05$). Demnach läßt sich mit der Bestimmung von Flußkontrollkoeffizienten das Ausmaß der funktionellen Veränderung von Mitochondrien in „skinned fibers“ quantifizieren. Der durchschnittliche Heteroplasmiegrad der Deletionen lag bei 50 ± 17 .

Von Kunz et al., wurden unter ähnlichen Bedingungen an „skinned muscle fibers“ von CPEO-Patienten ebenfalls erhöhte C_o -Werte für die COX gefunden. Der Anstieg war wahrscheinlich vom Heteroplasmiegrad abhängig. Bei einem Heteroplasmiegrad von 11 % fand er einen $C_{oCOX} = 0,27$ und bei 49 % Heteroplasmie einen $C_{oCOX} = 0,53$. Für den Komplex I fanden sich keine Vergleichswerte. Der erste Nachweis pathologisch erhöhter Flußkontrollkoeffizienten stammt von Mazat (Rigoulet et al., 1988). Hier wurde bei Rattenhirnen experimentell ein Hirnödem erzeugt. Tatsächlich bewirkte dies für die Succinatdehydrogenase einen Anstieg des $C_{oKomplex II}$ von praktisch Null auf 0,5.

5.6 Abhängigkeit von I_{50} -Werten von der Komplexität des Untersuchungssystem

Wendet man die Schwellenwertproblematik und die Abhängigkeit der Titrationskurven von der Systemgröße (s. Abb. 12) auf die Ermittlung von Hemmstoffkonzentrationen, die zur 50-prozentigen Hemmung eines Enzyms führen, so ergibt sich zwangsläufig, daß diese I_{50} -Werte ebenfalls von der Systemgröße abhängen und vom isolierten Enzym zu intakten Mitochondrien um etwa eine Größenordnung zunehmen können. So nimmt wie in Abb. 12 dargestellt, der I_{50} Wert für Cyanid mit der Größe des metabolischen Systems zu von 3 μM auf 20 μM Cyanid zu. Hier mag man einwenden, daß für die Ermittlung der I_{50} -Werte die jeweils empfindlichste Methode angewendet werden sollte. Jedoch kann man viele Enzyme, wie den AdN-Translokator an intakten Mitochondrien nicht als Einzelenzym sondern nur in seinem Einfluß auf das metabolische System messen, was im Vergleich zu direkt am Enzym bestimmten Konstanten zu höheren I_{50} -Werten führen muß. Dieses Problem läßt sich aber durch Anwendung der Metabolischen Kontrollanalyse umgehen. Mittels der Inhibitor-Fittungsmethode lassen sich prinzipiell die richtigen Dissoziationskonstanten ermitteln. Die Angabe beider Konstanten würde dann sowohl die Affinität des Inhibitors zum Enzym als auch die Auswirkung der Hemmung auf das metabolische System widerspiegeln.

5.7 Experimentelle Bestimmung von Flußkontrollkoeffizienten auf die Atmung in intakten Zellen.

Die Aussagefähigkeit der an isolierten Mitochondrien oder in permeabilisierten Fasern bestimmten Fluxkontrollkoeffizienten ist begrenzt. Sie gelten streng genommen nur für die Bedingungen unter denen sie gemessen wurden. Bislang gab es nur wenige Versuche die Flußkontrolle in intaktem Gewebe zu messen.

So hat Duszynski die Flusskontrolle des AdN-Translokators in intakten Hepatocyten mit $Co_{AdNT} = 0.3$ bestimmt (Duszynski et al., 1982). Die Gruppe von Attardi versuchte kürzlich die Flusskontrolle der Cytochromoxidase in intakten Zellkulturen zu bestimmen (Villani et al., 1998). Sie verglichen dafür die Hemmung des Einzelenzym COX und der Atmung in dem sie den Sauerstoffverbrauch der COX registrierten. Zunächst wurde der Sauerstoffverbrauch der intakten Mitochondrien gemessen (metabolischer Fluß). Nach Zusatz von Antimycin A, Ascorbat und TMPD wurde dann die individuelle Aktivität der COX erfasst. Jedoch gelang es Attardi und Mitarbeitern anscheinend nicht Co-Werte zu bestimmen, denn sie stellten nur sogenannte Tresholdplots auf, die die Aussage erlauben, in welchem Ausmaß die Aktivität des untersuchten Enzyms ausgelastet ist, bzw wieviel zusätzliche Enzymaktivität noch als Reserve vorliegt. Diese Untersuchungsmethode setzt aber voraus, dass sowohl der Fluß als auch die Einzelenzymaktivität in intakten Zellen gemessen werden kann. Die Cytochromoxidase ist jedoch eines der wenigen Enzyme deren Aktivität sich überhaupt in intakten Zellen messen lässt. Für viele andere Enzyme z.B. Translokatoren und die Komplexe der Atmungskette trifft dies aber nicht zu. Deshalb lag es nahe, die Inhibitor-Fittungsmethode für dieses Problem zu verwenden.

Wie in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt, läßt sich die Atmung von intakten Zellen mit den Hemmstoffen Azid und Cyanid hemmen. Jedoch fällt auf, daß zur Erreichung der 50 %-Hemmung deutlich höhere Hemmstoffkonzentrationen erforderlich sind, als in den Systemen ohne intakte Zellwand. So stiegen für die Azid-Titration die I_{50} -Werte von Mitochondrien in „skinned fibers“ von $I_{50} = 390 \mu\text{M}$ auf $I_{50} = 1200 \mu\text{M}$ in intakten Zellen (endogene Atmung) an. Für die Cyanid-Titration war der Anstieg ähnlich. Drei mögliche Ursachen sollten dabei diskutiert werden. Zum einen könnte die K_d in intakten Zellen und in Systemem mit zugänglichen Mitochondrien unterschiedlich sein, wofür es aber keinen Anhaltspunkt gibt. Zum Zweiten könnte die Membran der Passage der Inhibitor-moleküle einen Widerstand entgegensetzen. In diesem Falle müßte eine verlängerte Inkubationszeit zu stärkeren Hemmungen führen, was aber nicht beobachtet wurde, denn bei den Titrationsexperimenten wurde darauf geachtet, daß die Atmungsgeschwindigkeiten stationär waren, bevor eine weitere Zugabe erfolgte. Wahrscheinlicher ist die dritte Variante. Das Potential der intakten Zellmembran, könnte die Verteilung der negativ geladenen Inhibitor-moleküle zu beiden Seiten der Membran beeinflussen. Dieser Vorgang würde dann zu höheren Inhibitor-konzentrationen außerhalb der Zellen führen. Aus diesem Grunde müssen die Dissoziationskonstanten als scheinbare angesehen werden. Da die Untersuchung dieses Phänomens den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte, muß man bei der

Bewertung der Ergebnisse strikt darauf achten, nur solche C_o miteinander zu vergleichen, die unter vergleichbaren Bedingungen gemessen wurden.

5.8 Wie ist die Kontrolle der COX unter in VIVO Bedingungen?

Ein Vergleich der an intakten Zellen und an Mitochondrien ermittelten C_{oCOX} ergab systematische Unterschiede, denn die Flußkontrolle war für die endogene Atmung in intakten Zellen generell höher ($C_{oCOX} = 0,25-0,32$) als für die state 3 Atmung in „skinned fibers“ ($C_{oCOX} = 0,23$). Die metabolischen Bedingungen denen die Mitochondrien in intakten Zellen und in „skinned fibers“ ausgesetzt waren sind sehr unterschiedlich. In den „skinned fibers“ herrschten state 3 Bedingungen, also Überschuß an den Substraten Sauerstoff, Pyruvat und Malat. In intakten Zellen kann man jedoch den state 3 Zustand nicht einstellen. Insbesondere ist die intrazelluläre Pyruvatkonzentration viel geringer. Auch für Sauerstoff wurden Konzentrationsgradienten zwischen der „bulk phase“ und den Mitochondrien nachgewiesen (Gnaiger et al., 1998). Andererseits gibt es in den intakten Zellen endogene Substrate, wie Fettsäuren und Aminosäuren. Die endogene Atmung in intakten Zellen betrug etwa 37 % der entkoppelten Atmung. Da die Flußkontrolle eines Enzyms mit abnehmender Flußrate abnimmt (Gellerich et al., 1983), sollte sie also bei 37 % der Maximalgeschwindigkeit deutlich geringer sein als unter state 3-Bedingungen. Demnach kann man vermuten, daß die C_{oCOX} in intakten Zellen deutlich höher sein wird als in isolierten Mitochondrien. Bei Entkopplung der Mitochondrien in intakten Zellen stieg die C_{oCOX} beträchtlich von 0,3 bzw. 0,25 auf 0,80 bzw. 0,88 bei glatten Gefäßmuskelzellen und von 0,32 bzw. 0,32 auf 0,83 bzw. 0,87 bei Myoblasten an. Die Erklärung für diesen Anstieg liegt zum einen in der drastischen Erhöhung der Atmungsgeschwindigkeit und in der deutlichen Verkleinerung des Metabolischen Systems, denn die Atmungsgeschwindigkeit hängt unter entkoppelten Bedingungen nicht mehr von der Translokation (ADP, Pi) und der Phosphorylierung sondern nur von den Komplexen I,II,III und IV der Atmungskette ab. Die Kontrolle verteilt sich demnach auf weniger Enzyme und der relative Beitrag eines Enzyms erhöht sich dadurch.

Ein weiterer großer Unterschied zwischen isolierten Mitochondrien und solchen in intakten Zellen, besteht im fehlenden onkotischen Druck bei zellfreien Systemen. So konnte mit Hilfe rekonstituierter Systeme gezeigt werden, daß die Durchlässigkeit der mitochondrialen Außenmembran für Substrate mit zunehmendem onkotischen Druck abnimmt (Gellerich et al., 1987) (Gellerich und Korzeniewski, unveröffentlicht). Dadurch steigen die Konzentrationsgradienten z. B für die maximale ADP Diffusionsgeschwindigkeit vom Cytosol in den Intermembranspalt von 8 auf 30 μM ADP.

Eine verminderte Zugänglichkeit der Substrate zu den mitochondrialen Translokatoren sollte aber zu Begrenzungen bei den maximalen Atmungsraten führen und damit Umverteilungen der Flußkontrollkoeffizienten der Enzyme der Oxidative Phosphorylierung verursachen.

5.9 CRABTREE-Effekt

Interessanterweise stieg die C_{COX} in intakten Cybrids nach Glukosegabe von 0,31 auf 0,42 und in Cybrids mit der „common deletion“ sogar von 0,59 auf 0,72, obwohl in beiden Fällen die Zellatmung abnahm. Die Zunahme der Kontrolle kann durch die steigende Komplexität des metabolischen Systems erklärt werden. Die Zellinkubation erfolgte in einem glukosefreien Medium, demnach ist die Glykolyse weitgehend inaktiv und kann mit den Mitochondrien nicht um das bei der Zellarbeit entstehende ADP konkurrieren. Nach Glucosezusatz wird jedoch die Glykolyse einen bedeutsamen Teil der ADP-Regenerierung übernehmen, weshalb die Atmungsrate absinkt. Wenn jetzt die Mitochondrien partiell gehemmt werden und weniger ADP phosphorylieren, könnte es zu einem leichten Anstieg des cytosolischen ADP kommen, welches dann von der Glykolyse phosphoryliert werden könnte. Demnach könnte sich eine partielle Hemmung der Mitochondrien stärker auswirken, was Ausdruck eine erhöhten Kontrolle auf die Atmung ist. In Experimenten mit Lebermitochondrien und Pyruvatkinase konnte die Konkurrenz der Oxidativen Phosphorylierung und der extramitochondrialen ATP-Regenerierung um ADP untersucht und mittels Inhibitortitrationen quantifiziert werden (Gellerich et al., 1983).

Der CRABTREE-Effekt ist ein lang bekanntes Phänomen und bezeichnet die Abnahme der Zellatmung nach Glukosezusatz. Der Mechanismus ist umstritten (Wojtczak et al., 1999; Rodriguez-Enriquez et al., 2001; Ainscow und Martin 1999; Bogucka und Wojtczak 1999). Wahrscheinlich ist der Mechanismus komplizierter als es durch eine einfache Competition zwischen Mitochondrien und der Glykolyse um das bei der Zellarbeit entstehende ADP beschrieben werden kann. So wurde kürzlich gezeigt, daß es nach der Glukosegabe zur Erhöhung von cytosolischem Calcium kommt, was zu einer vermehrten Aufnahme in die Mitochondrien führen und über die Hemmung der F_0F_1 ATPase zu einer Verminderung der Atmung führen soll (Wojtczak et al., 1999). Dieser Vorschlag ist Teil eines generellen Konzeptes nachdem die Mitochondrienfunktion über cytosolisches Calcium reguliert wird. Es gibt aber zunehmend Hinweise dafür, daß die Mitochondrien selbst an die Regulation des cytosolischen Kalziums beteiligt sind! Es war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit den Mechanismus des CRABTREE-Effektes aufzuklären. Interessant ist der Befund, nachdem das Ausmaß des CRABTREE-Effektes in Cybridzellen mit „common deletion“ größer ist als in

normalen Cybrids. Zur Erklärung dieses Befundes kann man die durch den Atmungskettendefekt verursachte vergrößerte Kontrolle der Mitochondrien anführen, die den Anteil der Mitochondrien an der gesamten ATP Bildung der Zelle vermindert.

5.10 Auswirkungen der „common deletion“ auf die funktionellen Eigenschaften der Cybrids

Bei den auf die Zellzahl bezogenen endogenen Atmungsraten der Cybrids mit und ohne „common deletion“ fällt auf, daß diese gleich waren (s. Tab. 5). Dies ist verwunderlich, denn die relative Aktivität der Atmungskettenkomplexe war zwischen 30 und 50 % vermindert und der Mitochondriengehalt war nicht verändert. Die entkoppelte Atmung war aber bei den Deletions-Cybrids signifikant vermindert, wenn auch der zahlenmäßige Unterschied gering war (-13 %). Das heißt, daß auch die deletierten Mitochondrien noch in der Lage waren, den geringen ATP-Bedarf, der unter endogenen Bedingungen herrschte, zu realisieren. Im Gegensatz dazu fand Murphy bei ähnlichen Untersuchungen, daß die ATP-Synthese bei Deletions-Cybrids deutlich vermindert war (Porteous et al., 1998). Dieser Widerspruch könnte darauf hindeuten, daß bei den deletierten Mitochondrien die ebenfalls verminderte ATPase Aktivität einen starken Kontrolleinfluß hat. Diese wird aber bei der Messung der entkoppelten Atmung nicht mit erfaßt. Außerdem könnte die Effizienz der Oxidativen Phosphorylierung bei deletierten Mitochondrien vermindert sein, was sich in verminderten RCI auswirken würde. Für diese Möglichkeit spricht die Verminderung der RCI, die bei unseren CPEO-Patienten beobachtet wurde (Abb.11).

6 Zusammenfassung

Trotz intensiver Bemühungen ist der Zusammenhang zwischen Genotyp und Phenotyp bei Mutationen der mtDNA nicht voll verstanden. Aus verschiedenen Gründen sind die Diagnostik und das Verständnis der Auswirkungen von Mutationen der mtDNA erschwert. So gibt es neben den hereditären Veränderungen der Mitochondrien bei mitochondrialen Enzephalomyopathien auch sekundäre Störungen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und beim Altern. Das über 800 Gene umfassende mitochondriale Genom ist zu komplex, um mit dem gegenwärtigen Stand der Methodenentwicklung alle genetischen Ursachen erfassen zu können. Hinzu kommt, daß akute Störungen der Mitochondrien z.B. bei Ischämie, Entzündung und Rhabdomyolyse wahrscheinlich mit genetischen Methoden überhaupt nicht detektierbar sind. Weitere Probleme, die einer Aufklärung der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen entgegenstehen sind die Mitochondrienproliferation und die zahlreichen Möglichkeiten der methodischen Fehler bei der Untersuchung der Mitochondrien auf enzymatischem und funktionellem Level (Gellerich et al., 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, qualitative und quantitative Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei CPEO-Patienten mit „single deletions“ zu ermitteln. So sollte untersucht werden, ob unterschiedliche Deletionen gleiche oder verschiedene mitochondriale Störungen verursachen.

Weiterhin bestand die Aufgabe die Flusskontrolle der COX und die von Komplex I auf die mitochondriale Atmungsgeschwindigkeit in menschlichen permeabilisierten Muskelfasern von Normalprobanden und von CPEO-Patienten im Vergleich zu den anderen bioenergetischen Parametern (state 3 Atmung; Verhältnis von Komplex I- und Komplex II-abhängiger Atmung, SRPR; Aktivität der Atmungskettenkomplexe) zu messen.

Zum vollen Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen ist es wichtig zu wissen, wie sich eine Mutation im mtGenom auf die Funktion der Mitochondrien IN VIVO auswirkt, denn bei der Untersuchung der Mitochondrien im isolierten Zustand muß man von total veränderten Umweltbedingungen für die Mitochondrien (onkotischer Druck, Viskosität, Metabolitkonzentrationen, Komplexität des Stoffwechselsystems) ausgehen. So gibt es bis heute keine verlässlichen Daten zu den Kontrolleigenschaften der wichtigsten mitochondrialen Enzyme unter IN VIVO-Bedingungen. Demnach war es die wichtigste Aufgabe dieser Arbeit, die $C_{O_{COX}}$ in intakten humanen Zellen (Myoblasten, Glatte Gefäßmuskelzellen) und in Cybrids unter verschiedenen metabolischen Zuständen zu bestimmen, und am Beispiel der „common deletion“ zu prüfen, ob es mit Hilfe der

Flußkontrollkoeffizienten möglich ist, pathologische Änderungen der Mitochondrienfunktion zu quantifizieren.

In der Skelettmuskulatur von CPEO-Patienten mit „common deletion“ fanden sich mit zunehmender Heteroplasmie zunehmende Aktivitäten an Citratsynthase, dem wichtigsten mitochondrialen Leitenzym. Demnach nahm die Mitochondrienmenge in der betroffenen Muskulatur zu. Parallel dazu nahmen die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I, I+III, II+III, III und der Cytochromoxidase linear ab. Gleichsinnig dazu nahm auch die Mitochondrienfunktion, gemessen an der Pyruvat- und auch der Succinatatmung, ab. Diese linearen Abnahmen waren unabhängig von der Deletionsgröße. Anhand dreier Patienten mit gleichen Heteroplasmiegraden aber stark unterschiedlicher Deletionsgröße, konnte gezeigt werden, daß die Deletion der tRNA-Gene von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung ist, und daß die zusätzliche Deletion von Proteingenen keine zusätzliche Schädigung verursacht.

In „skinned fibres“ gesunder Kontrollen war Co_{COX} ($0,23 \pm 0,07$) doppelt so hoch, wie $Co_{Komplex\ I}$ ($0,11 \pm 0,02$). Damit in Übereinstimmung wurde gefunden, daß die state 3 Atmung linear mit der COX Aktivität korreliert und daß es keine überschüssige COX-Aktivität zu geben scheint. Wurde die Kontrolle der COX in Muskelhomogenat mit NADH als Substrat bestimmt, so vergrößerte sich ihre Kontrolle ($Co_{COX} = 0,74$), entsprechend der Verkleinerung der metabolischen Systems auf die Atmungskette.

In CPEO-Patienten stieg die Kontrolle beider Enzymer deutlich an ($Co_{Komplex\ I} = 0,33$; $Co_{COX} = 0,31$). Bei der Untersuchung außerhalb intakter Zellen wurden die separat bestimmten Dissoziationskonstanten $K_d = 3 \mu M$ Cyanid, $K_d = 93 \mu M$ Azid und $K_d = 94 \mu M$ Amytal für die nichtlineare Fittung der Daten verwendet.

In intakten Zellen stiegen die Dissoziationskonstanten jedoch an ($K_d = 12,9 \mu M$ KCN und $K_d = 160 \mu M$ Azid), was wahrscheinlich am Einfluß des Zellmembranpotentials auf die Verteilung der negativ geladenen Inhibitormoleküle liegt, weshalb man in diesem Fall von scheinbaren Dissoziationskonstanten sprechen muß. Mit Hilfe dieser Konstanten konnten erstmals Flußkontrollkoeffizienten der Cytochromoxidase in intakten Zellen also unter IN VIVO-Bedingungen bestimmt werden. Es ergaben sich für die Cytochromoxidase in intakten humanen Zellen (Myoblasten, $Co_{COX} = 0,32/0,32$; glatte Gefäßmuskelzellen, $Co_{COX} = 0,25/0,3$) und in Cybrids ($Co_{COX} = 0,31$) erhöhte Flußkontrollkoeffizienten. Diese stiegen nach Entkopplung entsprechend der Verkleinerung des metabolischen Systems stark an (Cybrids, $Co_{COX} = 0,74$; Myoblasten, $Co_{COX} = 0,83$; Glatte Gefäßmuskelzellen $Co_{COX} = 0,88$). Auch nach Glukosezusatz zu den Myoblasten und Cybrids stieg die Flußkontrolle an, was mit der Konkurrenz der Mitochondrien und der Glykolyse um ADP zu erklären ist.

In Cybrids mit der „common deletion“ und einem Heteroplasmiegrad von 47 % stieg die Flußkontrolle der Cytochromoxidase von $Co_{COX} = 0,31$ im Wildtyp auf $Co_{COX} = 0,59$ an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Flusskontrollkoeffizienten mit Hilfe von Inhibitortitrationen der Mitochondrienfunktion gemessen. Die Berechnung erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Die Anwendbarkeit dieser an isolierten Mitochondrien erprobten Methode für intakte Zellkulturen eröffnet neue Möglichkeiten für die quantifizierende Erfassung mitochondrialer Funktionsverluste innerhalb intakter lebender Zellen.

7 Literaturverzeichnis

- Ainscow EK; Martin MD. Top-down control analysis of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 263 (1999) 671-685.
- Arrigon O; Singer TP. Limitation of phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenase. *Nature* 193 (1962) 1256-1258.
- Balijepalli S; Kenchappa RS; Boyd MR; Ravindranath V. Protein thiol oxidation by haloperidol results in inhibition of mitochondrial complex I in brain regions: comparison with atypical antipsychotics. *Neurochem Int* 38 (2001) 425-435.
- Battientos A; Marin C; Miro O; Casademont J; Gomez M; Nunes V; Tolosa E; Urbano-Marquez A; Cardellach F. Biochemical and molecular effects of chronic haloperidol administration in brain and muscle mitochondria of rat. *J Neurosci Res* 53 (1989) 475-481.
- Bianchi C; Genova ML; Castelli GP; Lenaz G. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly. *J Biol Chem* 279 (2004) 36562-36569.
- Bogucka K; Wojtczak L. The Crabtree effect as a metabolic strategy of fast growing tumors and other rapidly proliferating cells. *Postepy Biochem* 45 (1999) 100-108.
- Bohnsack R; Gellerich FN; Schild L; Kunz W. The function of the adenine nucleotide translocator in the control of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1018 (1990) 182-184.
- Brand MD. Top-down elasticity analysis and its application to energy metabolism in isolated mitochondria and intact cells. *Mol Cell Biochem* 184 (1998) 13-20.
- 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.
- Brown GC. Control and regulation in bioenergetics. Bioenergetics; A Practical Approach. Oxford University Press (1995).
- Brown S; Taylor NL. Inhibition of mitochondrial succinate oxidation by antipsychotic medication. *Vet Hum Toxicol* 42 (2000) 209-211.
- Bu X.; Yang HY; Shohat M; Rotter JI. Two-locus mitochondrial and nuclear gene models for mitochondrial disorders. *Genet Epidemiol* 9 (1992) 27-44.
- Chen Y; Müller SP; Tostlebe M; Zierz S; Holtz J; Gellerich FN. Age-dependent changes of mitochondrial properties in heart and m. soleus of Fisher rats. *Biochim Biophys Acta EBEC Short Report* (2004) 229.
- Deschauer M; Wieser T; Neudecker S; Lindner A; Zierz S. Mitochondrial 3243 A->G mutation (MELAS mutation) associated with painful muscle stiffness. *Neuromuscul Disord* 9 (1999) 305-307.
- Deschauer M; Muller T; Dreha S; Zierz S. Familial mitochondrial chronic progressive external ophthalmoplegia. Five families with differing genetics *Nervenarzt* 72 (2001) 122-129.
- Deschauer M; Neudecker S; Muller T; Gellerich FN; Zierz S. Higher proportion of mitochondrial A3243G mutation in blood than in skeletal muscle in a patient with cardiomyopathy and hearing loss. *Mol Genet Metab* 70 (2000) 235-237.
- Di Lisa F; Bernardi P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem* 184 (1998) 379-391.
- Duszynski J; Groen AK; Wanders RJ; Vervoorn RC; Tager JM. Quantification of the role of the adenine nucleotide translocator in the control of mitochondrial respiration in isolated rat-liver cells. *FEBS Lett* 146 (1982) 262-266.
- Fato R; Estornell E; Bernardo SD; Pallotti F; Castelli GP; Lenaz G. Steady-state kinetics of the reduction of coenzyme Q Analogs by complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase) in bovine heart mitochondria and submitochondrial particles. *Biochemistry* 35 (1996) 2705-2716.

- Flint HJ; Porteous DJ; Kacser H. Control of the flux in the arginine pathway of *Neurospora crassa*. The flux from citrulline to arginine. *Biochem J* 190 (1980) 1-15.
- Gellerich FN; Saks VA. Control of heart mitochondrial oxygen consumption by creatine kinase: the importance of enzyme localization. *Biochem Biophys Res Commun* 105 (1982)1473-1481.
- Gellerich FN; BohnensackR; Kunz W. Control of mitochondrial respiration. The contribution of the adenine nucleotide translocator depends on the ATP- and ADP-consuming enzymes. *Biochim Biophys Acta* 722 (1983) 381-391.
- Gellerich FN; Schlame M; Bohnensack R; Kunz W. Dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space of rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 890 (1987) 117-126.
- Gellerich FN; Kunz WS; Bohnensack R. Estimation of flux control coefficients from inhibitor titrations by non-linear regression. *FEBS Lett* 274 (1990) 167-170.
- Gellerich FN. The role of adenylate kinase in dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space. *FEBS Lett* 297 (1992) 55-58.
- Gellerich FN; Wagner M; Kapischke M; Wicker U; Brdiczka D. Effect of macromolecules on the regulation of the mitochondrial outer membrane pore and the activity of adenylate kinase in the inter- membrane space. *Biochim Biophys Acta* 1142 (1993) 217-227.
- Gellerich FN; Kapischke M; Kunz W; Neumann W; Kuznetsov A; Brdiczka D; Nicolay K. The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. *Mol Cell Biochem* 133-134 (1994) 85-104.
- Gellerich FN; Ulrich J; Kunz W. Unusual properties of mitochondria from the human term placenta are caused by alkaline phosphatase. *Placenta* 15 (1994) 299-310.
- Gellerich FN; Laterveer FD; Korzeniewski B; Zierz S; Nicolay K. Dextran strongly increases the Michaelis constants of oxidative phosphorylation and of mitochondrial creatine kinase in heart mitochondria. *Eur J Biochem* 254 (1998) 172-180.
- 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.
- 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 diseases. *Biochem Soc Trans* 28 (2000) 164-169.
- Gellerich FN; Trumbeckaite S; Opalka JR; Chen Y; Neuhoff C; Schlag H; Zierz S. Mitochondrial dysfunction at sepsis: Evidences from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Bioscience Report* 22 (2002) 99-113.
- Gellerich FN; Laterveer FD; Zierz S; Nicolay K; The quantitation of ADP diffusion gradients across the outer membrane of heart mitochondria in the presence of macromolecules. *Biochim Biophys Acta* 1554, (2002) 48-56
- Gellerich FN; Deschauer M; Müller T; Chen Y; Opalka JR; Zierz S. Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes linearly correlate with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Acta* 1556 (2002) 41-52.
- Gellerich FN; Trumbeckaite S; Müller T; Chen Y; Deschauer M; Gizatullina Z; Zierz S. Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Biochem* 265 (2003)
- Gellerich FN; Mayr H; Reuter S; Sperl W; Zierz S. The problem of Interlab Variation in Methods for Mitochondrial Disease Diagnosis: Enzymatic Measurement of Respiration Chain Complexes. *Mitochondrion* . in press (2004)

- Gnaiger E; Lassnig B; Kuznetsov AV; Margreiter R. Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell. Effect of ADP on oxygen kinetics. *Biochim Biophys Acta* 1365 (1998) 249-254.
- Guan MX; Fischel-Ghodsian N; Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 5 (1996) 963-971.
- Harding AE; Sweeney MG; Miller DH; Mumford CJ; Kellar-Wood H; Menard D; McDonald WI; Compston DA. Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *Brain* 115 (1992) 979-989.
- Halangk W; Bohnensack R. Quantification of sperm motility by a turbidimetric assay. Correlation to respiration. *Biomed Biochim Acta* 45 (1986)331-341.
- Hatefi Y; Rieske IS. The preparation and properties of DPNH-cytochrome-c-reductase (Complex I-III of respiratory chain). *Methods Enzymol* 10 (1967) 225-31.
- Heinrich R; Rapoport TA. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur J Biochem* 42 (1974) 89-95.
- Heinrich R; Rapoport TA. Mathematical analysis of multienzyme systems. II. Steady state and transient control. *Biosystems* 7 (1975) 130-136.
- Hurko O; Johns DR; Rutledge SL; Stine OC; Peterson PL; Miller NR; Martens ME; Drachman DB; Brown RH; Lee CP. Heteroplasmy in chronic external ophthalmoplegia: clinical and molecular observations. *Pediatr Res* 28 (1990) 542-548.
- James AM; Sheard PW; Wei YH; Murphy, M.P. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem* 259 (1999) 462-469.
- Jennings RB; Herdson PB; Sommers HM. Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. *Lab Invest* 20 (1969) 548-557.
- Kacser H; Burns JA. Molecular democracy: who shares the controls. *Biochem Soc Trans* 7 (1979) 1149-1160.
- Kacser H; Burns JA. The control of flux. *Biochem Soc Trans* 23 (1995) 341-366.
- Kadenbach B; Arnold S. A second mechanism of respiratory control. *FEBS Lett* 447 (1999) 131-134.
- Khuchua Z; Belikova Y; Kuznetsov AV; Gellerich FN; Schild L; Neumann HW; Kunz WS. Caffeine and Ca²⁺ stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human skeletal muscle fibers due to activation of actomyosin ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1188 (1994) 373-379.
- Krähenbühl 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.
- Kunz WS; Gellerich FN; Schild L; Schönfeld P. Kinetic limitations in the overall reaction of mitochondrial oxidative phosphorylation accounting for flux-dependent changes in the apparent $\Delta G_{\text{oxP}}/\Delta \mu_{\text{H}^+}$ ratio. *FEBS Lett* 233 (1988) 17-21.
- Kunz WS; Kuznetsov A; Schulze W; Eichhorn K; Schild L; Striggow F; Bohnensack R; Graßhoff H; Neumann HW; Gellerich FN. Functional characterisation of oxidative phosphorylation in saponin-skinned muscle fibers. *Biochim Biophys Acta* 1144 (1993) 46-53. (Anlage 8)
- Kunz WS; Kuznetsov AV; Clark F; Tracey I; Elger CE. Metabolic consequences of the cytochrome c oxidase deficiency in brain of copper-deficient Mo(vbr) mice. *J Neurochem* 72 (1999) 1580-1585.
- Kunz WS; Kudin A; Vielhaber S; Elgert CE; Attardi G; Villani G. Flux Control of Cytochrome c oxidase in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 275 (2000) 27741-27745.
- Kunz WS. Control of oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1504 (2001) 12-19.

- Kuznetsov AV; Winkler K; Kirches E; Lins H; Feistner H; Kunz WS. Application of inhibitor titrations for the detection of oxidative phosphorylation defects in saponin-skinned muscle fibers of patients with mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1360 (1997) 142-150.
- Laterveer FD; Gellerich FN; Nicolay K. Macromolecules increase the channeling of ADP from externally associated hexokinase to the matrix of mitochondria. *Eur J Biochem* 232 (1995) 569-577.
- 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.
- Laterveer FD; Nicolay K; Gellerich FN. Experimental evidence for dynamic compartmentation of ADP at the mitochondrial periphery: coupling of mitochondrial adenylate kinase and mitochondrial hexokinase with oxidative phosphorylation under conditions mimicking the intracellular colloid osmotic pressure. *Mol Cell Biochem* 174 (1997) 43-51.
- Lertrit P; Kapsa RM; Jean-Francois MJ; Thyagarajan D; Noer AS; Marzuki S; Byrne E. Mitochondrial DNA polymorphism in disease: a possible contributor to respiratory dysfunction. *Hum Mol Genet* 3 (1994) 1973-1981.
- Lestienne P; Nelson J; Riederer P; Jellinger K; Reichmann H. Normal mitochondrial genome in brain from patients with Parkinson's disease and complex I defect. *J Neurochem* 55 (1990) 1810-1812.
- Letellier T; Malgat M; Mazat JP. Control of oxidative phosphorylation in rat muscle mitochondria: implications for mitochondrial myopathies. *Biochim Biophys Acta* 1141 (1993) 58-64.
- Letko G; Halangk W. Effect of improved hydrogen supply on energy state, ureogen and gluconeogenesis in isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 45 (1986) 265-71.
- Luft R. Luft's disease revisited. Severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control. *Mt. Sinai J. Med.* 59 (1992)140-145.
- Luft R. The development of mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta* 1271 (1995): 1-6.
- Mazat JP; Reder C; Letellier T. Why are most flux control coefficients so small? *J Theor Biol* 182 (1996) 253-258.
- 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.
- Morgan-Hughes JA; Hanna MG. Mitochondrial encephalomyopathies: the enigma of genotype versus phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1410 (1999) 125-145.
- Moslemi AR; Melberg A; Holme E; Oldfors A. Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia: distribution of multiple mitochondrial DNA deletions. *Neurology* 53 (1999) 79-84.
- Murdock DG; Christacos NC; Wallace DC. The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 4350-4355.
- Müller T; Deschauer M; Gellerich FN; Schulte-Mattler WJ; Zierz S. Near-infrared spectroscopy of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with respiratory chain diseases *Eur J Med Res* 5(Supplement 1), 12. Abstract.
- Newsholme EA. Regulation of enzyme activity . *Sci Prog* 53 (1965) 237-255.
- Noack H;Gellerich FN; Isenberg G. Oxidant induced mitochondrial permeability transition in HeLa- and smooth muscle A10 cells: glycolytic activity modulates susceptibility to oxidants and type of cell death. *Biochim Biophys Acta* Submitted.
- Opalka JR; Wicke M; Gellerich FN; Zierz S; von Lengerken G. Influence of mitochondrial function on growth and meat quality in turkey. *Eur J Med Res* (2000) 5 (Supplement 1), 57. Abstract

- Ozawa T; Tanaka M; Ino H; Ohno K; Sano T; Wada Y; Yoneda M; Tanno Y; Miyatake T; Tanaka T. Distinct clustering of point mutations in mitochondrial DNA among patients with mitochondrial encephalomyopathies and with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 176 (1991) 938-946.
- Papa S; Sardanelli AM; Scacco S; Technikova-Dobrova Z. cAMP-dependent protein kinase and phosphoproteins in mammalian mitochondria. An extension of the cAMP-mediated intracellular signal transduction. *FEBS Lett* 444 (1999) 245-249.
- Phelka AD; Beck MJ; Philbert MA. 1,3-Dinitrobenzene inhibits mitochondrial complex II in rat and mouse brainstem and cortical astrocytes. *Neurotoxicology* 24 (2003) 403-415.
- Porteous WK; James AM; Sheard PW; Porteous CM; Packer MA; Hyslop SJ; Melton JV; Pang CY; Wei YH; Murphy MP. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Eur J Biochem* 257 (1998) 192-201.
- Prezant TR; Agopian JV; Bohlman MC; Bu X; Oztas S; Qiu WQ; Arnos KS; Cortopassi GA; Jaber L; Rotter JI. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4 (1993) 289-294.
- Ragan CI; Wilson MT; Darley-Usmar MT; Lowe PN. Sub-fractionation of mitochondria and isolation of the protein of oxidative phosphorylation. In Darley-usmar VM, Rickwood D, Wilson MT (Hrsg.): *Mitochondria, a Practical Approach*. Oxford, Washington DC. IRL Press (1987): 98
- Reichmann H; Janetzky B. Mitochondrial dysfunction--a pathogenetic factor in Parkinson's disease. *J Neurol* 247 (2000) II63-II68.
- Rigoulet M; Averet W; Mazat JP; Guerin B; Cohadon F. Redistribution of the flux-control coefficients in mitochondrial oxidative phosphorylation in the course of brain edema. *Biochim Biophys Acta* 192 (1988) 116-123.
- Rosenstock TR; Carvalho AC; Jurkiewicz A; Frussa-Filho R; Smaili SS. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 88 (2004) 1220-1228.
- Rossignol R; Malgat M; Mazat JP; Letellier T. Threshold effect and tissue specificity: Implication for mitochondrial cytopathies. *J Biol Chem* 274 (1999) 33426-33432.
- Rossignol R; Faustin B; Roch C; Malgat M; Mazat JP; Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 370 (2003) 751-762.
- Rustin P; Munnich A; Rotig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights in well-known enzyme. *Eur J Hum Genet* 10 (2002) 289-291.
- Schild L; Gellerich FN. Effect of the extramitochondrial adenine nucleotide pool size on oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 252 (1998) 508-512.
- Schulte-Mattler WJ; Müller T; Deschauer M; Gellerich FN; Iaizzo PA; Zierz S. Quantitative assessment of fatigue in patients with mitochondrial encephalomyopathies *Eur J Med Res* (2000) 5(Supplement 1): 13-14. Abstract.
- Schwerzmann K; Hoppeler H; Kayar SR; Weibel ER. Oxidative capacity of muscle and mitochondria: Correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 1583-1587.
- Shepherd D; Garland PB. Citrate synthase from rat liver. *Methods Enzymol* 13 (1969) 11-16.
- Sickmann A; Reinders J; Wagner Y; Joppich C; Zahedi R; Meyer HF; Schonfisch B; Perschil I; Chacinska A; Guiard B; Rehling O; Pfanner Meisinger C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (2003) 13207-13212.
- Silvestri G; Servidei S; Rana M; Ricci E; Spinazzola A; Paris E; Tonali P. A novel mitochondrial DNA point mutation in the tRNA(Ile) gene is associated with progressive external ophthalmoplegia. *Biochem Biophys Res Commun* 220 (1996) 623-627.
- Skulachev VP. The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology *Exp Gerontol* 36 (2001) 995-1024.

- Soriano ME; Nicolosi L; Bernardi P. Desensitization of the Permeability Transition Pore by Cyclosporin A Prevents Activation of the Mitochondrial Apoptotic Pathway and Liver Damage by Tumor Necrosis Factor- α . *J Biol Chem* 297 (2004).
- 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.
- Szczęśna-Kaszmarek A; Litwinska D; Popigini J. Oxidation of NADH via an "external" pathway in skeletal-muscle mitochondria and its possible role in the repayment of lactacid debt. *J Biochem* 16 (1984) 1231-1235.
- Szewczyk A; Wojtczak L. Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol Rev* 54 (2002) 101-127.
- Tisdal HD. Preparation and properties of succinic cytochrome c reductase (Complex II-III). *Methods Enzymol* 10 (1967) 213-15.
- 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.
- van den Heuvel L; Smeitink J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. *Bioessays* 23 (2001) 518-525.
- Veech LR; Lawson JWR; Cornell NW; Krebs HA. Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem*. 254 (1979) 1583-1587.
- 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.
- Vielhaber S; Kunz D; Winkler K; Wiedemann FR; Kirches E; Feistner H; Heinze HJ; Elger CE; Schubert W; Kunz WS. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 123 (2000) 1339-1348.
- Villani G; Greco M; Papa S; Attardi G. Low reserve of cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types. *J Biol Chem.*, 273 (1998) 31829-31836.
- Villani G; Attardi G. In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in human cells. *Free Radic Biol Med* 29 (2000) 202-210.
- Wallace DC. 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 57 (1995) 201-223.
- Wharton DC; Tzagaloff A.. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol* 10 (1967) 245-50.
- Wiedemann FR; Kunz WS. Oxygen dependence of flux control of cytochrome c oxidase - implications for mitochondrial diseases. *FEBS Lett* 422 (1998) 33-35.
- Wicke M; Gellerich FN; Greb N; von Lengerken G; Zierz S. Oxygraphische Untersuchung der Mitochondrienfunktion. Verwendung permeabilisierter Fasern von Muskelbiopsien des Schweines. *Fleischwirtschaft* 3 (2000): 78-82.
- Wicker U; Bucheler K; Gellerich FN; Wagner M; Kapischke M; Brdiczka D. Effect of macromolecules on the structure of the mitochondrial inter-membrane space and the regulation of hexokinase. *Biochim Biophys Acta* 1142 (1993) 228-239.
- Wisniewski E; Kunz WS; Gellerich FN. Phosphate affects the distribution of flux control among the enzymes of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria. *J Biol Chem* 268 (1993):9343-9346.
- Wisniewski E; Gellerich FN; Kunz WS. Distribution of flux control among the enzymes of mitochondrial oxidative phosphorylation in calcium-activated saponin-skinned rat musculus soleus fibers. *Eur J Biochem*. 230 (1995): 549-554.
- Wojtczak L; Teplova VV; Bogucka K; Czyz A; Makowska A; Wieckowski MR; Duszynski J; Evtodienko YV. Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in Ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial

- energetics. Further arguments for the role of Ca(2+) in the mechanism of the crabtree effect. *Eur J Biochem* 263 (1999) 495-501
- Youssef JA; Badr MZ. Disruption of mitochondrial energetics and DANN synthesis by the anti-aids drug dideoxyinosine. *Toxicol Lett* 60 (1992) 197-202.
- Zhang C; Bills M; Quigley A; Maxwell RJ; Linnane AW; Nagley P. Varied prevalence of age-associated mitochondrial DNA deletions in different species and tissues: a comparison between human and rat. *Biochem Biophys Res Commun* 230 (1997) 630-635.

8 Thesen

- 1.) Trotz intensiver Bemühungen ist der Zusammenhang zwischen Genotyp und Phenotyp bei Mutationen der mtDNA nicht voll verstanden. Aus verschiedenen Gründen ist die Diagnostik und das Verständnis der Auswirkungen von Mutationen der mtDNA erschwert. So gibt es neben den hereditären Veränderungen der Mitochondrien bei mitochondrialen Enzephalomyopathien auch sekundäre Störungen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und beim Altern. Das über 800 Gene umfassende mitochondriale Genom ist zu komplex, um mit dem gegenwärtigen Stand der Methodenentwicklung alle genetischen Ursachen erfassen zu können. Hinzu kommt, daß akute Störungen der Mitochondrien bei Ischämie, Entzündung und Rhabdomyolyse wahrscheinlich mit genetischen Methoden überhaupt nicht detektierbar sind. Weitere Probleme, die einer Aufklärung der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen entgegenstehen, sind die Mitochondrienproliferation und zahlreiche methodische Fehlermöglichkeiten.
- 2.) Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Muskelbiopsien von 25 Patienten mit CPEO (Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie) und „single deletions“ im Vergleich zu denen von 22 gesunden Probanden, qualitative und quantitative Genotyp-Phenotyp-Beziehungen zwischen mutierter mtDNA und der Mitochondrienfunktion zu ermitteln. Weiterhin sollte der Einfluß der „common deletion“ auf die mitochondrialen Eigenschaften von Cybrids untersucht werden.
- 3.) Die untersuchten Deletionen der mt-DNA unterschieden sich in der Deletionsgröße und betrafen daher unterschiedliche Genorte. Die Auswirkungen des unterschiedlichen Ausfalls von Proteingenen und von tRNA-Genen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert werden.
- 4.) Zum vollen Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen ist es wichtig zu wissen, wie sich eine Mutation im mitochondrialen Genom auf die IN VIVO-Funktion der Mitochondrien auswirkt, denn bei der Untersuchung der Mitochondrien im isolierten Zustand sind die Umweltbedingungen für die Mitochondrien (onkotischer Druck, Viskosität, Metabolitkonzentrationen, Komplexität des Stoffwechselsystems) total verändert. So gibt es bis heute keine verlässlichen Daten über die

Kontrolleigenschaften der wichtigsten mitochondrialen Enzyme unter IN VIVO-Bedingungen.

- 5.) Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Flusskontrollkoeffizienten der Cytochromoxidase (Co_{COX}) und vom Komplex I der Atmungskette ($Co_{Komplex\ I}$) auf die mitochondriale Atmungsgeschwindigkeit in humanen permeabilisierten Muskelfasern von Normalprobanden und von CPEO-Patienten im Vergleich zu anderen bioenergetischen Parametern (state 3 Atmung; Verhältnis von Komplex I- und Komplex II-abhängiger Atmung, SRPR; Aktivität der Atmungskettenkomplexe) zu messen.
- 6.) Außerdem sollten die Flusskontrollkoeffizienten der Cytochromoxidase in intakten humanen Zellen (Myoblasten, glatte Gefäßmuskelzellen) und in Cybrids unter verschiedenen metabolischen Zuständen bestimmt werden. Am Beispiel der „common deletion“ galt es zu prüfen, ob es mit Hilfe von Flusskontrollkoeffizienten möglich ist, pathologische Veränderungen der Mitochondrienfunktion zu quantifizieren.
- 7.) In der Skelettmuskulatur von CPEO-Patienten mit „common deletion“ fanden sich mit zunehmender Heteroplasmie signifikant zunehmende Aktivitäten an Citratsynthase, dem wichtigsten mitochondrialen Leitenzym. Dagegen nahmen die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I, I+III, II+III, III, der Cytochromoxidase und auch der Mitochondrienfunktion (Pyruvatatmung) linear und signifikant ab.
- 8.) Die lineare Abnahme der Aktivitäten mitochondrialer Enzyme war unabhängig von der Deletionsgröße. Anhand dreier Patienten mit gleichen Heteroplasmiegraden aber stark unterschiedlicher Deletionsgröße, konnte gezeigt werden, daß bei Deletionen vom Typ der „common deletion“ dem Fehlen der tRNA-Gene für die Aminosäuren Serin, Histidin und Leucin die entscheidende pathophysiologische Bedeutung zukommt. Dagegen verursacht die zusätzliche Deletion von Proteingenen keine zusätzliche Schädigung.
- 9.) In „skinned fibres“ gesunder Kontrollen war die Flusskontrolle der COX ($Co_{COX} = 0,23 \pm 0,07$) doppelt so hoch, wie die vom Komplex I ($Co_{Komplex\ I} = 0,11 \pm 0,02$).

- 10.) In Übereinstimmung mit der relativ hohen Flusskontrolle der COX wurde gefunden, daß die state 3 Atmung von CPEO Patienten und gesunden Kontrollen linear mit der COX-Aktivität korrelierte und daß es demnach keine überschüssige COX-Aktivität zu geben scheint.
- 11.) Im Vergleich zu intakten Mitochondrien in „skinned fibers“ erhöhte sich die Flusskontrolle der Cytochromoxidase im Muskelhomogenat ($C_{COX} = 0,74$), was der Verkleinerung des metabolischen Systems auf die Atmungskettenkomplexe I bis IV (COX) entsprach.
- 12.) In „skinned fibers“ von CPEO-Patienten stieg die Flußkontrolle der Cytochromoxidase ($C_{COX} = 0,31$) und von Komplex I ($C_{Komplex\ I} = 0,33$) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich an. Dies kann als quantitatives Maß der mitochondrialen Funktionsänderung durch die verminderten Enzymaktivitäten (Komplex I: -46%; Cytochromoxidase: -56 %) gegenüber den gesunden Kontrollen gewertet werden.
- 13.) Für die Berechnung der Flußkontrollkoeffizienten in Mitochondrien außerhalb intakter Zellen wurden die separat bestimmten Dissoziationskonstanten $K_d = 3\ \mu\text{M CN}^-$, $K_d = 93\ \mu\text{M Azid}$ und $K_d = 94\ \mu\text{M Amytal}$ verwendet. In intakten Zellen stiegen die Dissoziationskonstanten für Azid und Cyanid jedoch deutlich an, was wahrscheinlich am Einfluß des Zellmembranpotentials auf die Verteilung der negativ geladenen Inhibitormoleküle um die Zellmembran lag ($K_d = 12,8\ \mu\text{M KCN}$ und $K_d = 160\ \mu\text{M Azid}$). Demnach sollte man in diesen Fällen von scheinbaren Dissoziationskonstanten sprechen.
- 14.) Bei der Titration der Cytochromoxidase in verschiedenen metabolischen Systemen fanden sich mit steigender Komplexität steigende I_{50} -Werte für Azid und Cyanid. ($COX_{\text{Homogenat, Isolierter Schritt}}, I_{50} = 1,5\ \mu\text{M Cyanid}$; $COX_{\text{Homogenat, NADH}}, I_{50} = 3\ \mu\text{M Cyanid}$; $COX_{\text{Intakte Mitochondrien}}, I_{50} = 20\ \mu\text{M Cyanid}$). Die in unterschiedlichen Systemen gemessenen I_{50} Werte können demnach zu Fehleinschätzungen der Toxizität der Hemmstoffe führen. Man sollte statt dessen die Dissoziationskonstanten zwischen Hemmstoff und Enzym bestimmen, die nicht von der Größe des metabolischen Systems abhängig sind. Ein Vergleich der K_d mit den I_{50} -Werten würde dann

zusätzliche Informationen über die metabolischen Auswirkungen von Hemmstoffgaben erlauben.

- 15.) Mit Hilfe dieser Dissoziationskonstanten konnten erstmals Flusskontrollkoeffizienten der Cytochromoxidase in intakten humanen Zellen also bezüglich der Mitochondrien praktisch unter IN VIVO-Bedingungen bestimmt werden. Sie betragen in Myoblasten $Co_{COX} = 0,32$ bzw. $0,32$ und in glatten Gefäßmuskelzellen $Co_{COX} = 0,25$ bzw. $0,30$ für Cyanid bzw Azid.
- 16.) Bei Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung stieg die Flußkontrolle der Cytochromoxidase in intakten Zellen entsprechend der Verkleinerung des metabolischen Systems stark an (Myoblasten, $Co_{COX} = 0,85$; Glatte Gefäßmuskelzellen $Co_{COX} = 0,84$).
- 17.) In Cybrids mit der „common deletion“ und einem Heteroplasmiegrad von 47 % stieg die Flußkontrolle der Cytochromoxidase von $Co_{COX} = 0,31$ im Wildtyp auf $Co_{COX} = 0,59$ an.
- 18.) Im Vergleich mit der endogenen Atmung nahm nach Zusatz von 37 mM Glukose die Atmung bei Cybrids mit „common deletion“ (-49 %) signifikant stärker ab beim Wildtyp (-28 %). Demnach steigt durch die Deletionen das Ausmaß des CRABTREE-Effektes in Cybrids an. Zusätzlich stieg die Flusskontrolle der Cytochromoxidase (Cybrids_{Wildtyp}, $Co_{COX} = 0,42$; Cybrids_{common deletion}, $Co_{COX} = 0,72$) gegenüber den endogenen Bedingungen an. Dieser Anstieg der Co_{COX} nach Glukosezusatz läßt sich durch das Anschalten der Glycolyse erklären, die sich bei der Inhibitortitration zunehmend in der Konkurrenz der Mitochondrien und der Glycolyse um das bei der Zellarbeit entstehende ADP durchsetzt.
- 19.) Die vorliegende Arbeit ermöglichte erstmals den Vergleich der Flußkontrolle von Cytochromoxidase auf die Atmung von isolierten Mitochondrien ($Co_{COX} = 0,23$) mit der Atmung intakter lebender Zellen ($Co_{COX} > 0,3$). Könnte man die Atmung intakter Zellen auch unter Bedingungen maximaler oxidativer Phosphorylierung messen (was nicht möglich ist), wäre dieser Unterschied wahrscheinlich noch höher.

20.) Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Flußkontrollkoeffizienten mit Hilfe von Inhibitortitrationsen der Mitochondrienfunktion gemessen und mittels nichtlinearer Regression berechnet. Die ansteigenden Flusskontrollkoeffizienten infolge mutationsbedingter Enzymverminderungen erlauben eine Quantifizierung von Funktionsdefiziten bei mitochondrialen Erkrankungen auf der Ebene isolierter Mitochondrien und von intakten Muskelzellen. Diese Methoden eröffnen neue Möglichkeiten für die quantifizierende Erfassung mitochondrialer Funktionsverluste.

9 Anhang

Lebenslauf

Name: Ying Chen
Geburtsdatum: 03.02.1961
Geburtsort: Nanton, P.R.China
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:
02/1966 - 01/1978 Grundschule und Kaiyuan Gymnasium, Zhejiang, China
Abschluß: Abitur

Studium:
03/1978 - 12/1982 Studium der Medizin an der Zhejiang Medizin Universität (Jetzt Zhejiang Universität), VR China
Abschluß: "Bachelor of Medicine"

09/1985 - 07/1988 Postgraduierter der Fakultät für Medizinische Biochemie, Zhejiang Medizin Universität (Jetzt Zhejiang Universität), VR China.
Thema der Dissertation: "Effect of schistosomiasis Japonicum on some enzymes of DMH biotransformation in mice and morphological changes of large intestines."
Abschluß: "Master of Medicine"

Berufstätigkeit:
02/1983 - 08/1985 Wiss. Assistentin, Institut für Biochemie, Zhejiang Medizin Hochschule Wenzhou, China

08/1988 - 04/1993 Wissenschaftlerin und Ärztin. Zhejiang Public Health Epidemic Prevention Station, Zhejiang, China

Seit 04.2000 Wissenschaftliche Assistentin, im Muskellabor der Neurologischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit 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.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich habe noch nie zuvor einen Promotionsversuch unternommen. Diese Arbeit ist an keiner anderen Hochschule eingereicht worden.

Halle, den 30.11.2004

Ying Chen

Publikationen

In Fachzeitschriften

- 1.) Gellerich, F.N. Trumbeckaite, S. Opalka, J.R., Chen, Y., Neuhoff, C., Schlag, H. and Zierz, S. (2002) Mitochondrial dysfunction at sepsis: Evidences from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Bioscience Report* 22, 99-113
- 2.) Gellerich, F.N., Chen, Y., Deschauer, M., Müller, T. and Zierz, S. (2002) Energetic depression caused by mitochondrial impairments. *Eur Cytokine Netw.* 13, 395-397
- 3.) Gellerich, F.N. Deschauer, M. .Chen, Y., Müller, T. and S. Zierz (2002) Functional impairment of mitochondria in skinned fibers of CPEO patients with single and multiple deletions of mt-DNA correlate with heteroplasmy. *Biochim Biophys Acta* 1556, 41-52
- 4.) Gellerich, F.N., Trumbeckaite, S. Müller, T., Chen, Y, Deschauer, M., Gizatullina Z, and Zierz, S. (2003) Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Biochem* 265
- 5.) Gizatullina, Z.Z., Ying Chen, Zierz, S., and Gellerich, F,N. Effects of extramitochondrial ADP on permeability transition of mouse liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* in the press
- 6.) Gizatullina, Z., Chen, Y., Lindenberg, K., Kosinski, S., Harjes, P., Landwehrmeyer, G.B., Zierz, S. Gellerich, F. N. Skeletal muscle is impaired in Huntington Disease: Increased Ca^{++} sensitivity of complex I dependent respiration and of permeability transition in mitochondria combined with pathological trichrome staining of skeletal muscle in R6/2 mice. (Fertig zur Einreichung).

Abstracts

- 1.) Chen Y, Kraft A, Trumbeckaite S, Opalka JR, Hein W, Gellerich FN. Untersuchung der Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern mit Hilfe der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration erlaubt die Detektion akuter und hereditärer Veränderungen am Komplex I der Atmungskette. *Nervenheilkunde* (2001).44
- 2.) Gellerich FN, Chen Y, Opalka JR, Müller T, Deschauer M, Zierz S. Funktionelle Störungen an Muskelmitochondrien von Patienten mit singulären und multiplen Deletionen korrelieren mit dem Heteroplasmiegrad. *Nervenheilkunde* (2001).32
- 3.) Chen Y, Wie YH, Loppnow H, Lochmüller H, Wussling M, Zierz S, Gellerich FN. Flux control of cytochrome-c-oxidase in intact human muscle cells and in cybrids with common deletion. *Biochim Biophys Acta Short Reports* (2002).323
- 4.) Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Müller T, Neudecker S, Zierz S. Genotype-phenotype relations in skeletal muscle of patients with deletions and point mutations of mtDNA. *Biochim Biophys Acta Short Reports* (2002).285
- 5.) Chen Y, Tostlebe M, Müller SP, Zierz S, Holtz J, Gellerich FN. Age dependent changes of mitochondrial properties in heart and m. soleus of Fisher rats. *Biochim Biophys Acta Short Reports* (2004).229
- 6.) Gellerich FN, Gizatullina Z, Chen y, Lindenberg KS, Landwehrmeyer BG, Zierz S. Calcium sensitivity of complex I-dependent respiration and of permeability transition in skeletal muscle mitochondria of huntington disease mice. *Biochim Biophys Acta Short Reports* (2004).59
- 7.) Gizatullina Z, Chen Y, Pallas T, Wussling M, Zierz S, Gellerich FN. Effects of haloperidol on energy metabolism, calcium-signalling in human myoblasts, and on permeability transition. *Biochim Biophys Acta Short Reports* (2004).239

Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. Zierz, Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. F.N. Gellerich, der mir das Thema überließ und mich als Betreuer dieser Arbeit mit großer Hilfsbereitschaft unterstützt hat. Er stand mir mit seinem Wissen und Erfahrungen jederzeit zur Seite.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Holtz, der diese Arbeit durch meine Anstellung im SFB 598 Project 1B ermöglichte und mit dem eine gute Zusammenarbeit bestand

Weiterhin gilt mein Dank Herrn PD Dr. Loppnow für die Zusammenarbeit bei der Kultivierung der Zellen, sowie Herrn Dr. Müller und Herrn PD Dr. Deschauer für die genetische Charakterisierung der Patienten.

Für die stete Unterstützung im Labor und die vielen aufmunternden Worte danke ich insbesondere Frau Scholz, sowie Frau Zietz, Frau Land und Frau Heinz.