

**Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. R. Haas

**Veränderungen zellulärer Nukleotidkonzentrationen
nach in-vitro-Blockierung der mitochondrialen Atmungskette**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Mete Dadak

2006

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez.:

Dekan : Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent : Prof. Dr. med. Norbert Gattermann

Korreferent: PD Dr. med. Rüdiger Wessalowski

Inhalt

	Seite
Inhalt	I
Abkürzungen	IV
1 Einführung	
1.1 Zielsetzung der Arbeit	1
1.2 Myelodysplastische Syndrome	2
1.3 Megaloblastäre Veränderungen als Folge von Störungen der Nukleotidsynthese	3
1.4 DHODH, das Bindeglied zwischen mitochondrialer Atmungskette und Pyrimidin-de-novo-Synthese	4
1.5 Wiederverwertung von DNA-Vorstufen zur Pyrimidinsynthese	7
1.6 Die Atmungskette	9
1.7 Das mitochondriale Genom	13
2 Material und Methoden	
2.1 Chemikalien	15
2.2 Untersuchungsmaterial	17
2.2.1 Zellkulturen aus Osteosarkomzellen und ihren ρ^0 -Transformanten	17
2.2.2 Keratinozyten	18
2.2.3 Mono-Mac-1-Zellen	18
2.2.4 Knochenmark von Patienten mit AML, MDS	19
2.3 Laborgeräte	20
2.3.1 Vitalitätsprüfung mit Trypanblau	22
2.4 Extraktion der Nukleotide	22
2.4.1 Lymphoprep-Separation	24
2.4.2 Aufbereitung der Zellen für die Extraktion	25
2.4.3 Zelllyse und Extraktion der Nukleotide nach Simmonds	27
2.5 Kultivierung von Mono-Mac-1-Zellen	28

2.5.1	Herstellung des Nährmediums	28
2.5.2	Dialyse des verwendeten Serums nach Simmonds	29
2.5.3	Nährmediumwechsel	29
2.5.4	Kulturansatz	30
2.6	Bestimmung der zellulären Nukleotidkonzentrationen mittels Anionen-Austausch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie	31

3 Ergebnisse

3.1	ρ^0 -Zellen in der Uridinmangelsituation	34
3.2	143B-Zellen unter Antimycin A- und Rotenonbehandlung	36
3.2.1	143B-Zellen unter Antimycin A-Behandlung	36
3.2.2	143B-Zellen unter Rotenonbehandlung	38
3.3	Keratinocyten unter Antimycin A- oder Rotenonbehandlung	40
3.4	ρ^0 -Transformanten mit unterschiedlich ausgeprägten Komplex-I-Defekten	44
3.4.1	C4T-Zellen unter Antimycin A- und Rotenonbehandlung	45
3.4.2	Gegenüberstellung der ρ^0 -Transformanten	47
3.5	Mono-Mac-1-Zellen	48
3.5.1	Atmungskettenblockade in Mono-Mac-1-Zellen unter Verwendung von nicht-dialysiertem Serum	48
3.5.2	Atmungskettenblockade in Mono-Mac-1-Zellen unter Verwendung von dialysiertem Serum	52
3.5.3	Nukleotidkonzentrationen nach zwei Tagen Blockerbehandlung	55
3.5.4	Nukleotidkonzentrationen nach vier Tagen Blockerbehandlung	56
3.6	Knochenmark von Patienten mit AML, MDS, NHL, T-ALL, CML	59

4 Diskussion

4.1	Nukleotidkonzentrationen in ρ^0 -Zellen (rho-0-Zellen)	66
4.2	Wirkung von Antimycin A und Rotenon auf die Nukleotidkonzentrationen	67
4.3	Wirkung der Atmungskettenblockade auf Mono-Mac-1-Zellen	70
4.4	Nukleotidkonzentration in Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS und AML	74

5	Literaturverzeichnis	77
6	Anhang mit Originaldaten	83

Abkürzungen

A	Antimycin A
ADPRP	ADP Ribosephosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
(C ₂ H ₅) ₂ O	Diethylether
CMP	Cytidylat
CML	Chronische myeloische Leukämie
Diff-BB	Differential-Blutbild
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FAB-Klassifikation	French-American-British Klassifikation
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FMS-Protoonkogen	McDonough feline sarcoma
HBSS-Puffer	Hanks' balanced salts
HCl	Salzsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
KM	Knochenmark
LHON	Leber's hereditary optic neuropathy
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MM	Multiples Myelom
MNC	mononukleäre Zellen
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
Na ₂ CO ₃	Natriumbicarbonat
Na	Natrium
NaCl 0,9%	physiologische Kochsalzlösung
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NaOH	Natronlauge
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PBS-Puffer	phosphate buffered saline

PV	Polycythaemia vera
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (excess of blasts)
RAEB-T	RAEB in Transformation
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RAS-Gen	Ratten Sarcoma-Gen
Rot	Rotenon
rpm	rounds per minute
RPMI Nährmedium	Roswell Park Memorial Institute
TCA	Trichloressigsäure
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie der T-Zellreihe
THF	Tetrahydrofolat
UDPGluc	UDP-Glucose
UDPGal	UDP-Galactose

1. Einführung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind erworbene klonale Knochenmarkerkrankungen, die hauptsächlich im höheren Lebensalter auftreten. Sie sind durch ineffektive Hämatopoese und dementsprechend durch einen Mangel an reifen Blutzellen gekennzeichnet (Jacobs, 1986). Im Knochenmark finden sich dysplastische Veränderungen, zu denen auch eine pathologische Eisenüberladung der Mitochondrien in den erythropoetischen Vorläuferzellen gehört, die das mikroskopische Bild der sogenannten Ringsideroblasten hervorruft. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass mitochondriale Defekte, möglicherweise ausgelöst durch altersabhängig auftretende Mutationen der mitochondrialen DNA, zum Phänotyp der myelodysplastischen Syndrome beitragen.

Es gibt bereits ein eindrucksvolles Beispiel für den Zusammenhang zwischen mitochondrialer Eisenüberladung und Defekten der mitochondrialen DNA (mtDNA). Bei dem seltenen kongenitalen Pearson-Syndrom (Rötig *et al.*, 1989), das regelmäßig mit einer sideroblastischen Anämie einhergeht, weisen alle Patienten ausgedehnte Deletionen der mtDNA auf. Bei Patienten mit MDS finden sich zwar keine ausgedehnten Deletionen, aber häufig Punktmutationen der mtDNA (Gattermann, 2000, Wulfert *et al.*, 2006).

Zum myelodysplastischen Phänotyp gehören auch megaloblastäre Veränderungen, die auf einen Defekt der Nukleotidsynthese mit konsekutiver Störung der DNA-Replikation hinweisen. Die Ursache hierfür ist jedoch unklar, da bei MDS kein Folsäure- oder Vitamin-B12-Mangel vorliegt. Möglicherweise beruhen die megaloblastären Veränderungen ebenfalls auf einer mitochondrialen Störung. Ein wichtiges Enzym der de-novo-Pyrimidinsynthese, die Dihydroorotatdehydrogenase (DHODH), ist nämlich in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und überträgt Elektronen auf die mitochondriale Atmungskette (Löffler *et al.*, 1997). Der physiologische Zusammenhang zwischen Pyrimidinbiosynthese und Atmungskettenfunktion wurde bisher allerdings noch nie im Kontext eines Atmungskettendefektes analysiert. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden deshalb sowohl normale menschliche Keratinozyten als auch Zellen einer Osteosarkomzelllinie *in vitro* mit Inhibitoren der Atmungskette, nämlich Rotenon und Antimycin A, behandelt. Anschließend wurden die Nukleotide extrahiert, um deren Konzentration durch HPLC zu messen. Wegen der potentiellen pathophysiologischen Bedeutung mitochondrialer Defekte bei MDS wurden solche Messungen auch an Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS durchgeführt.

1.2 Myelodysplastische Syndrome

Myelodysplastische Syndrome treten vor allem bei älteren Patienten auf. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt etwa beim 70. Lebensjahr (Aul *et al.*, 1992). Myelodysplastische Syndrome gehen von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle aus, deren Proliferation pathologisch gesteigert ist. Es kommt jedoch, im Gegensatz zu den myeloproliferativen Syndromen, nicht zu erhöhten Zellzahlen im peripheren Blut, sondern zu Zytopenien. Die aus der pathologisch veränderten Stammzelle hervorgehenden Tochterzellen weisen nämlich erhebliche Reifungsstörungen auf, reagieren nicht adäquat auf Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Merchav S *et al.*, 1991) und gehen zu einem großen Teil vorzeitig im Knochenmark durch Apoptose zugrunde (Greenberg *et al.*, 1998; Shetty *et al.*, 2000). Da die Produktion funktionsfähiger Blutzellen stark gestört ist, leiden die Patienten unter Anämiesymptomen, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung.

Bei etwa 25% der Patienten geht das myelodysplastische Syndrom im weiteren Krankheitsverlauf in eine akute myeloische Leukämie (AML) über. Diese Entwicklung ist häufig vom Auftreten chromosomaler Veränderungen begleitet, die Ausdruck der genetischen Instabilität der Knochenmarkszellen sind.

Bei etwa der Hälfte der MDS-Patienten findet sich schon bei der Erstdiagnose ein abnormer Karyotyp im Knochenmark. Etwa 50% der Aberrationen sind Deletionen der Chromosomen 5, 7, 11, 12, 13 und 20. Translokationen kommen bei MDS nur selten vor. Da Chromosomenveränderungen häufig erst relativ spät im Krankheitsverlauf auftreten (Mufti *et al.*, 1992; Willman, 2000), können sie nicht die primäre Ursache für die MDS-Pathogenese darstellen. Der Wachstumsvorteil und die Maturationsdefekte der MDS-Stammzellen müssen daher zumindest teilweise auf zytogenetisch unsichtbaren genomischen Veränderungen beruhen. Bei der Untersuchung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen fanden sich am häufigsten Mutationen der RAS-Gene, die bei etwa 10-20 Prozent der MDS-Patienten entdeckt wurden. RAS-Mutationen wurden als Risikofaktor für den Übergang des MDS in eine akute myeloische Leukämie diskutiert, finden sich aber auch bei stabilem Krankheitsverlauf und manchmal sogar im Knochenmark von gesunden Probanden. Sie scheinen, ähnlich wie Mutationen des FMS-Protoonkogens und p53-Mutationen, allein nicht in der Lage zu sein, ein myelodysplastisches Syndrom hervorzurufen. Wahrscheinlich müssen, ähnlich wie bei soliden Tumoren, mehrere Mutationen zusammenwirken, um ein MDS entstehen zu lassen. Die genetischen Läsionen, die eine Initiierung des MDS-Klons bewirken, sind noch nicht bekannt.

Da eine starke Altersabhängigkeit nicht nur bei der Inzidenz der myelodysplastischen Syndrome, sondern auch beim Auftreten von Mutationen der Mitochondrien-DNA zu verzeichnen ist, sollte eine mögliche Beteiligung von mtDNA-Mutationen bei der MDS-Pathogenese in Erwägung gezogen werden, insbesondere weil auch Stammzellen nicht von der altersabhängigen Akkumulation von mtDNA-Mutationen verschont bleiben. Taylor *et al.* (2003) konnten dies für Stammzellen der Dickdarmmukosa nachweisen, Shin *et al.* (2004) erhoben entsprechende Befunde an Vorläuferzellen des Knochenmarks.

Die pathophysiologischen Folgen von mtDNA-Mutationen betreffen die Funktion der mitochondrialen Atmungskette, da sämtliche Gene der Mitochondrien-DNA für Komponenten der Atmungskette kodieren. Ein Defekt der Atmungskette wirkt sich am ehesten auf die ATP-Regeneration aus, kann aber noch andere Folgen haben, wie zum Beispiel Beeinträchtigungen des mitochondrialen Eisenstoffwechsels (Gattermann, 2000) und der Pyrimidinbiosynthese. Letztere könnte über eine Störung der Konzentration der zellulären DNA-Bausteine eine defekte DNA-Replikation oder -Reparatur und damit eine Vielzahl genetischer Ereignisse nach sich ziehen (Kunz *et al.*, 1994). Dies wiederum könnte zumindest teilweise die genetische Instabilität des MDS-Klons erklären.

1.3 Megaloblastäre Veränderungen als Folge von Störungen der Nukleotidsynthese

Ein häufiges dysplastisches Merkmal im MDS-Knochenmark sind megaloblastäre Veränderungen der heranreifenden Zellen. Diese werden manchmal auch als megaloblastoid bezeichnet, da sie nicht exakt den megaloblastären Charakteristika des Folsäure- oder Vitamin-B12-Mangels entsprechen. Während sich bei den Mangelzuständen vor allem ein DNA-Synthesedefekt mit konsekutiven blastären Veränderungen des Zellkerns bemerkbar macht, kommen bei den megaloblastoiden MDS-Befunden noch Störungen der RNA- und Proteinsynthese hinzu (Wickramasinghe *et al.*, 1978).

Der DNA-Synthesedefekt bei Folsäure- und Vitamin-B12-Mangel beruht vor allem auf einer gestörten Bereitstellung des Pyrimidinnukleosids Thymidin. Folsäure wird über Dihydrofolat zum aktiven Tetrahydrofolat (THF) reduziert und fungiert in dieser Form als Coenzym beim Kohlenstofftransfer im Rahmen des Thymidinaufbaus. Bei unzureichender Konzentration an biologisch aktivem THF ist die Reparatur und Replikation der DNA deutlich verlangsamt. Bei mangelhafter Bereitstellung von 5,10-THF-Polyglutamat ist außerdem die Thymidilatsynthase-Reaktion beeinträchtigt, die UMP in TMP umwandelt. Da diese Umwandlung

Voraussetzung für die DNA-Synthese ist, für die RNA-Synthese jedoch nicht benötigt wird (hier wird Uracil statt Thymidin verwendet), wird bei Folsäuremangel die zytoplasmatische Reifung der Zellen kaum gestört, so dass eine sogenannte Kern-Plasma-Reifungsdissoziation entsteht.

Vitamin-B12 (Cobalamin) fungiert als Cofaktor bei der Aktivierung von 5-Methyl-THF zu THF, bei der auch Homocystein zu Methionin umgewandelt wird. Vitamin-B12 ist daher für die DNA-Synthese unerlässlich, so dass ein Mangel ebenfalls eine Kern-Plasma-Reifungsdissoziation und gestörte Zellproliferation hervorruft. Die wegen verzögerter Zellteilung abnorm großen Vorläuferzellen gehen vorzeitig im Knochenmark zugrunde und verursachen dadurch eine ineffektive Hämatopoese.

Megaloblastäre Veränderungen können als Hauptmerkmal von erworbenen Störungen der Pyrimidinbiosynthese angesehen werden. Eine weitere megaloblastäre Anämie, die hereditäre Orotazidurie, zeigt eine Vitamin-B12- und Folsäure-Resistenz. Ihre Ätiologie liegt in einem angeborenen Enzymdefekt der de-novo-Pyrimidinbiosynthese. Defekte im UMP-Synthase-Komplex behindern dabei die Verstoffwechslung der Orotsäure zu Uridylat, so dass Orotat sich anstaut und im Urin ausgeschieden wird. (Winkler *et al.*, 1988).

1.4 DHODH, das Bindeglied zwischen mitochondrialer Atmungskette und Pyrimidin-de-novo-Synthese

Wie bereits erwähnt, finden sich bei MDS häufig megaloblastoide Veränderungen im Knochenmark, ohne dass ein Folsäure- bzw. Vit-B12-Mangel oder ein definierter Enzymdefekt der Nukleotidbiosynthese vorliegen. Als Erklärungsversuch ist eine gestörte mitochondriale Atmungskettenfunktion vorgeschlagen worden (Gattermann *et al.*, 2000), da ein Schlüsselenzym der de-novo-Pyrimidinsynthese nur im Zusammenspiel mit einer intakten Atmungskette funktioniert. Dieses Enzym, die Dihydroorotatdehydrogenase (DHODH), ist das vierte Enzym der de-novo-Pyrimidinsynthese und katalysiert die Reaktion von Dihydroorotat zu Orotat (s. Abb. 1.1).

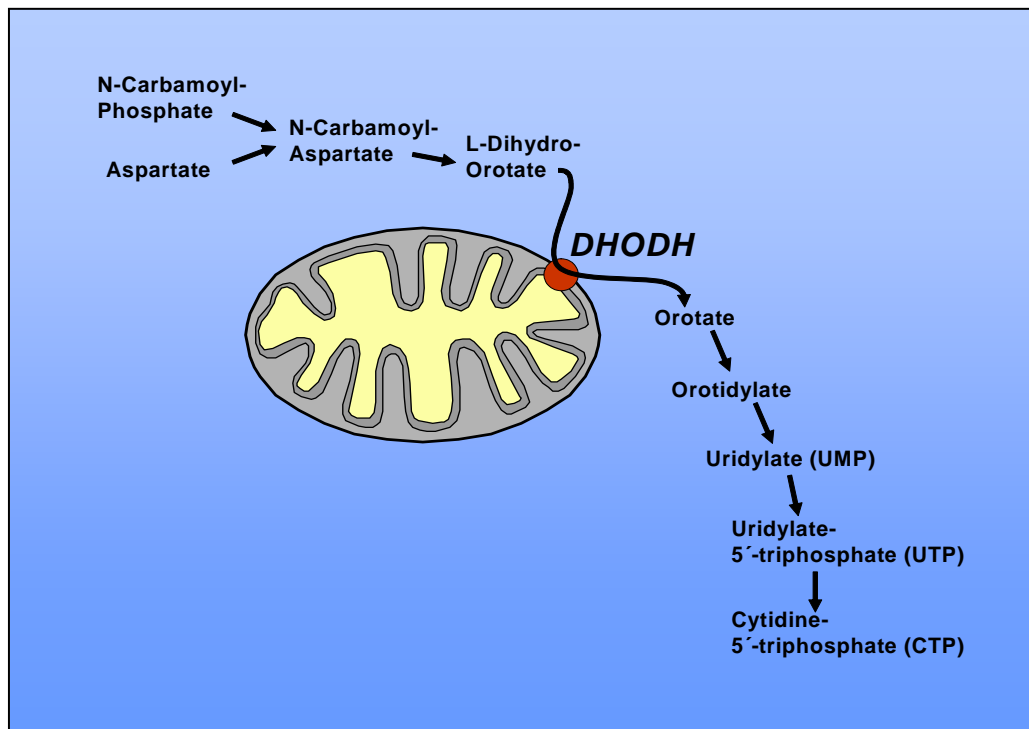


Abb. 1.1: Die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und verknüpft die de-novo-Pyrimidinsynthese mit der mitochondrialen Atmungskette.

Bei Säugetieren wird der Bedarf an Pyrimidinen sowohl durch eine Neusynthese von Uridylat (UMP) als auch durch eine Wiederverwertung von freien Nucleosiden gedeckt. Die an der Neusynthese beteiligte DHODH ist bei höheren Eukaryonten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und überträgt dort Elektronen auf die Atmungskette, speziell auf Ubichinon (Coenzym Q) (Abb. 1.2). In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass DHODH *in vitro* unter ubichinonfreien Bedingungen Elektronen unter Bildung von Wasserstoffperoxid auch auf O_2 übertragen kann. Dies entsprach ca. 15% der normalen DHODH-Aktivität (Angermüller & Löffler, 1994).

Die DHODH ist das einzige mitochondrial lokalisierte Enzym der Pyrimidinsynthese; die anderen fünf Enzyme befinden sich als Multienzymkomplexe im Zytoplasma. In niederen Organismen findet die Nucleotidsynthese komplett im Cytosol statt, hierbei fungieren Reduktionsäquivalente wie NAD als Elektronenakzeptoren der DHODH (Löffler M *et al.*, 1997).

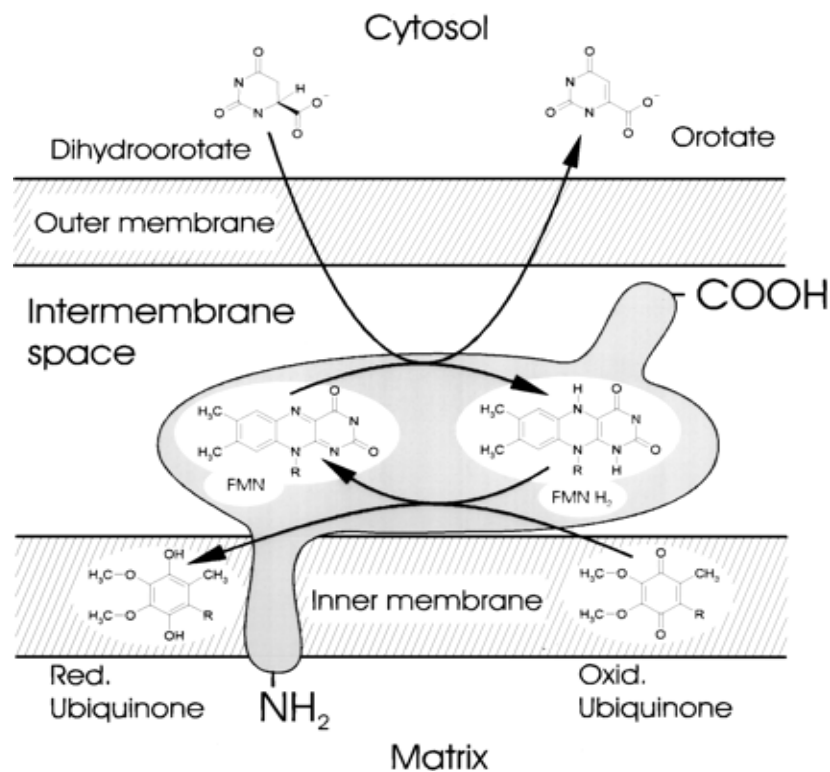


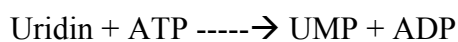
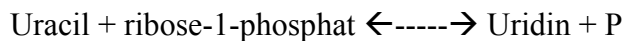
Abb. 1.2: Die Dihydroorotat-Ubichinon-Oxidoreduktase verbindet die Mitochondrien mit der Biosynthese von Pyrimidinnukleotiden (Löffler *et al.*, 1997).

Wegen der funktionellen Beziehung zwischen de-novo-Pyrimidinbiosynthese, DHODH und mitochondrialer Atmungskette in eukaryotischen Zellen könnte ein mitochondrialer Defekt zu einer Störung der Pyrimidinsynthese führen. Sauerstoffmangel, die Anwesenheit von Inhibitoren der Atmungskette wie Cyanid, Antimycin A oder Rotenon sowie angeborene und erworbene Defekte der Komplexe III und IV würden zu einer Beeinträchtigung der Uridylatsynthese (UMP) führen. Eine Arbeit von Beune *et al.* (2000) zeigte bereits eine Hemmung der Dihydroorotatdehydrogenaseaktivität durch Hemmung der Atmungskette mit Stickstoffmonoxid NO. Da aus UMP die Pyrimidinnukleotide Uridintriphosphat (UTP) und Cytidintriphosphat (CTP) entstehen, könnten grundsätzlich alle von diesen Nukleotiden abhängigen Reaktionen in Mitleidenschaft gezogen werden. Pyrimidine sind als Bausteine der DNA und RNA unerlässlich für Proliferation und Wachstum der Zellen und Gewebe. Sie dienen auch zur Aktivierung von Zuckern, die Fette und Proteine nach der Translation glykosylieren (Löffler M *et al.*, 1997).

1.5 Wiederverwertung von DNA-Vorstufen zur Pyrimidinsynthese

Eukaryonten haben die Möglichkeit, Pyrimidine energiesparend aus freien Basen und Nucleosiden herzustellen. Diese Pyrimidinbasen bzw. die entsprechenden Nucleoside fallen beim intrazellulären Abbau von Nucleinsäuren an, wie sie z. B. beim mRNA-turnover entstehen. Außerdem können sie durch intestinale Resorption aufgenommen werden, wie die erfolgreiche orale Gabe von Uridin bei der Behandlung der hereditären Orotazidurie zeigt. Die Basen und Nucleoside werden in wenigen Reaktionsschritten zum Nucleotid umgewandelt. Dabei wird die Base Uracil durch die Uridinphosphorylase zu Uridin umgewandelt und Uridin von der Uridinkinase zu Uridylat (UMP) phosphoryliert. Aus UMP können die restlichen Pyrimidine aufgebaut werden (Abb. 1.3). Diese Möglichkeit lässt sich bei der hereditären Orotazidurie therapeutisch nutzen. Der Enzymdefekt des UMP-Synthase-Komplexes, der die letzten Reaktionsschritte der de-novo-Synthese von UMP katalysiert, wird durch Substitution mit Uridin ausgeglichen. Der Defekt in der de-novo-Pyrimidinsynthese lässt sich also über den sogenannten *salvage pathway* kompensieren. Inwiefern bei Säugetieren zur Wiederverwertung von Pyrimidinbausteinen Cytidylat (CMP) aus Desoxycytidin über die Desoxycytidinkinase gewonnen wird, ist nicht geklärt.

Bei Therapie der hereditären Orotazidurie durch Gabe von Uridin treten 2 Reaktionen auf.



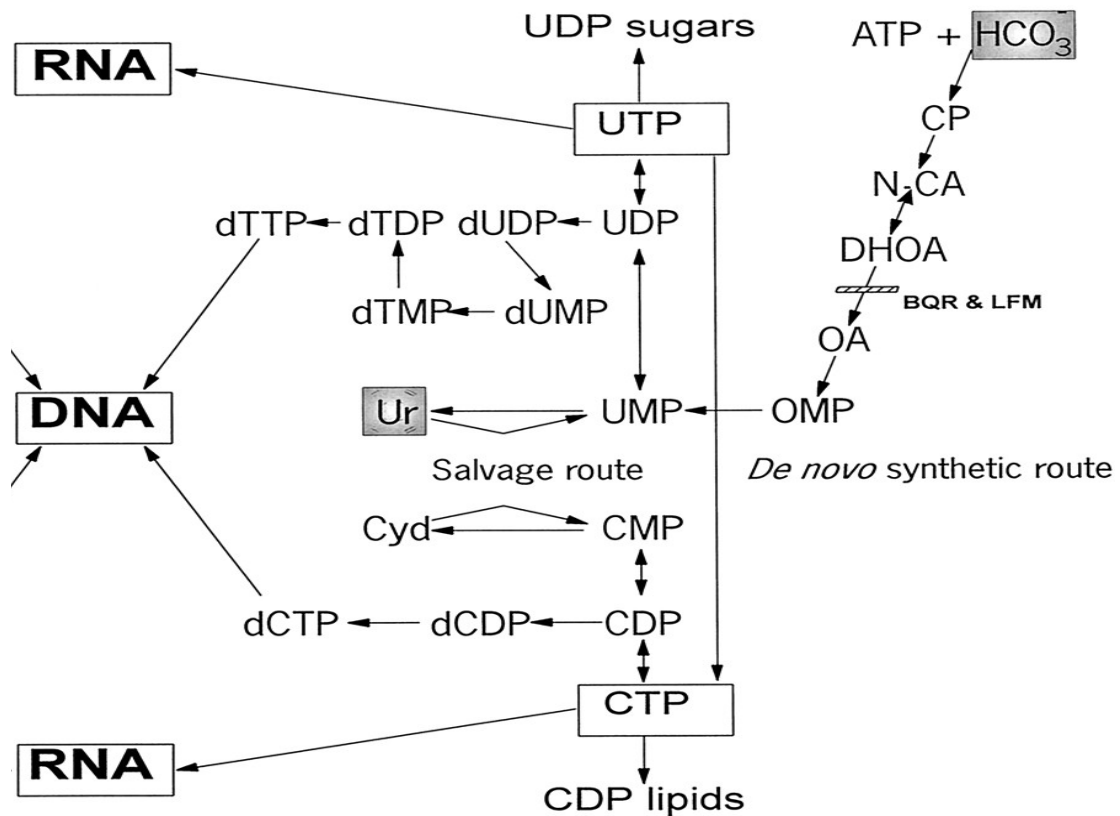


Abb. 1.3: De-novo-Pyrimidinbiosynthese und Wiederverwertung (*salvage route*) von Ribonucleosiden Uridin (Ur) und Cytidin (Cyd).

CP: Carbamoylphosphat, N-CA: Carbamoylaspartat, OA: Orotat, OMP: Orotidylat.

BQR und LFM (Brequinar und Leflunomid) sind DHODH-Inhibitoren. Rückemann *et al.* (1998).

Die Bedeutung des *salvage pathway* wurde unter anderem durch Experimente mit ρ^0 -Zellen nachgewiesen (Desjardins *et al.*, 1985). Dies sind Zellen, die keine mitochondriale DNA mehr besitzen. Es handelt sich um Zelllinien, die das Ergebnis einer Behandlung von menschlichen Osteosarkomzellen (143B-Zellen) mit Ethidiumbromid sind (King & Attardi, 1989). Dieser kanzerogene Stoff interkaliert in die mitochondriale DNA und verändert die Geometrie der ringförmigen Doppelhelix. Die DNA-Polymerase kann an der mtDNA nicht mehr binden und deshalb die Replikation nicht starten. Bei jeder Zellteilung nimmt daher der Gehalt an mitochondrialer DNA weiter ab, bis schließlich Zellen entstehen, die keine mtDNA mehr aufweisen und deshalb keine intakte Atmungskette mehr assemblieren können. Unter diesen Umständen wird die Zellproliferation abhängig von externer Zufuhr eines Pyrimidin-Ribonucleosids, z. B. Uridin, das über die Wiederverwertungsreaktion die Bereitstellung von Nucleotiden aufrechterhalten kann. Es ist allerdings nicht bekannt,

welcher Anteil des Nukleotidbedarfs beispielsweise in Knochenmarkzellen über die Wiederverwertung gedeckt werden kann.

1.6 Die Atmungskette

Mitochondrien haben eine äußere und eine innere Membran. Die innere Mitochondrienmembran trennt den Matrixraum vom Intermembranraum (s. Abb. 1.4). In der Matrix sind unter anderem der Citratzyklus und die Fettsäureoxidation lokalisiert. In der inneren Mitochondrienmembran befindet sich die Atmungskette, die aus drei Protonenpumpen und den sie verbindenden Elektronen-Carriern, Coenzym Q und Cytochrom C, besteht. Energiereiche Moleküle wie NADH oder FADH₂ entstehen bei der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und im Citratzyklus. Von diesen Reduktionsäquivalenten werden Elektronen über die Atmungskette auf O₂ übertragen, und zwar über Komplex I (NADH-Q-Reduktase), Komplex III (Cytochrom-Reduktase) und Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) (Kennedy & Lehninger). Über den Komplex II, Succinat-Q-Reduktase genannt, werden ebenfalls Elektronen von FADH₂ auf den Elektronen-Carrier Ubichinon übertragen, jedoch werden hier im Gegensatz zu den anderen Komplexen keine Protonen gepumpt. Der Fluss von Elektronen von NADH oder FADH₂ auf O₂ durch drei andere Proteinkomplexe führt dazu, dass Protonen aus der Matrix durch die innere Mitochondrienmembran nach außen gepumpt werden. Durch den Anstieg der H⁺-Konzentration auf der zytosolischen Seite entsteht ein elektrisches Potential. Dieses Potential und der Wasserstoffkonzentrationsgradient stellen die protonenmotorische Kraft dar, die den Rückstrom der Protonen durch den ATP-Synthase-Enzymkomplex antreibt (Mitchell *et al.*, 1961). Dabei wird aus ADP und Phosphat ATP regeneriert. Pro NADH werden 3, pro FADH₂ 2 ATP regeneriert.

Der Elektronentransport in der Atmungskette lässt sich durch spezifische Inhibitoren blockieren. In unseren Experimenten wurde Rotenon und Antimycin A verwendet. Rotenon hemmt die Elektronenübertragung innerhalb der NADH-Q-Reduktase, der Elektronenfluss über den Komplex II über Ubichinon wird dabei nicht beeinträchtigt. Antimycin A blockiert den Elektronenfluss in der Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase (Cytochrom-Reduktase) (s. Abb. 1.5). Dadurch wird proximal der Elektronentransfer über die Komplexe I und II und über die DHODH beeinträchtigt.

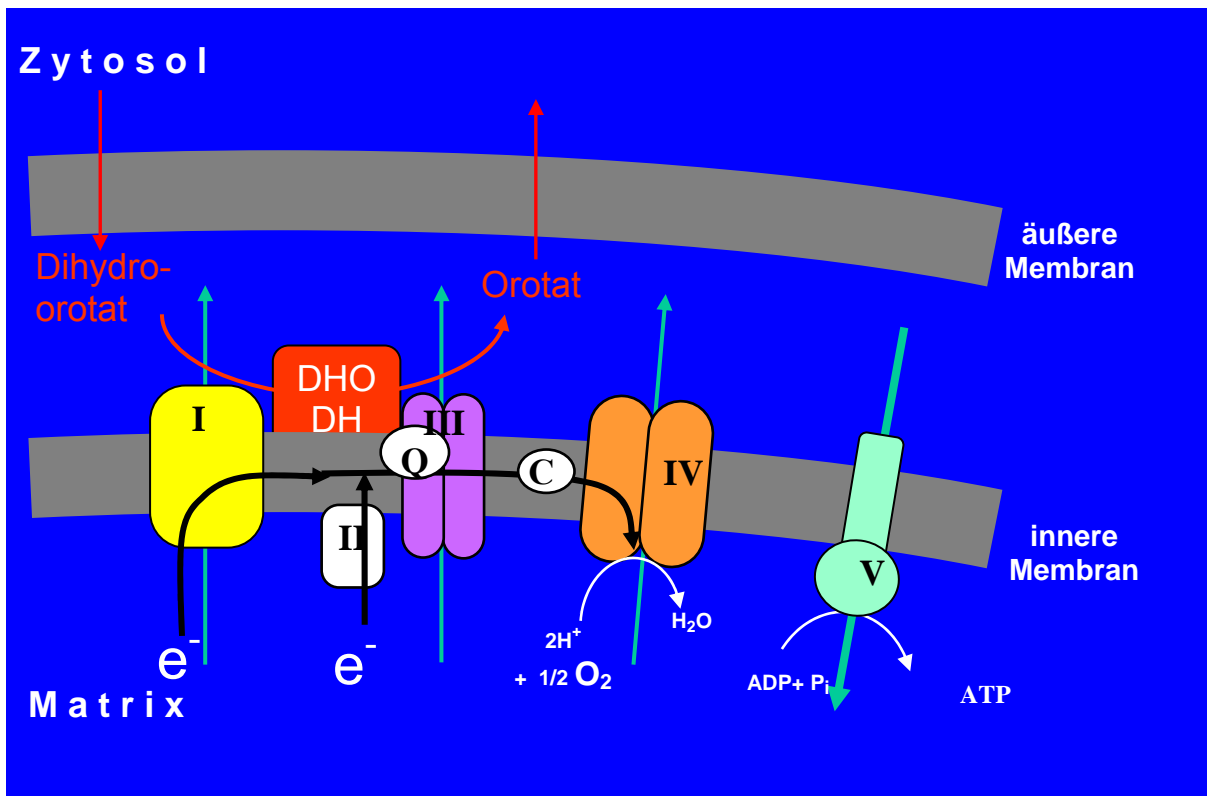


Abb. 1.4: Atmungskette und DHODH

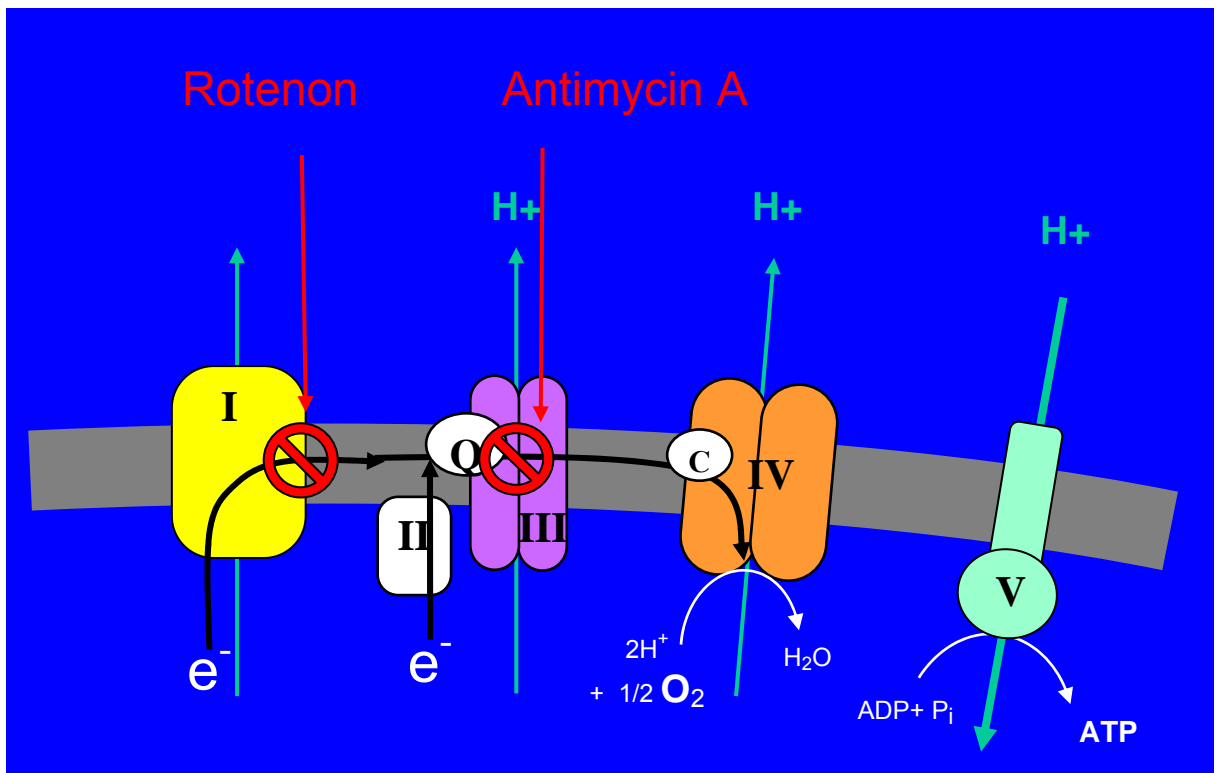


Abb. 1.5: Inhibierung der Atmungskette im Komplex I durch Rotenon und im Komplex III durch Antimycin A

Atmungskettendefekte können die ATP-Regeneration beeinträchtigen. Die Reaktion auf ATP-Mangel ist in Säugetierzellen hierarchisch strukturiert (Buttgereit F, 1995). Als erstes wird die energiereiche Synthese von Makromolekülen reduziert, es kommt also vor allem zur Einschränkung der Synthese von Proteinen und von DNA und RNA. Erst später wird der energieabhängige Ionen-Transport durch die Plasmamembran eingeschränkt, der für die zelluläre Homöostase und das Überleben der Zellen essentiell ist.

Nach diesem Muster könnte ein defekter Energiestoffwechsel auch die physiologische Ausreifung von Knochenmarkszellen bei MDS behindern.

ATP-Mangel könnte außerdem zu chromosomaler Instabilität beitragen. Der mitotische Spindelapparat, der die Chromosomen an der Äquatorialebene anordnet und die Trennung der Chromatiden auf die Tochterzellen bewirkt, basiert ganz wesentlich auf der Funktion von Motorproteinen, die wiederum auf ausreichende Bereitstellung von ATP oder GTP als Energiequelle angewiesen sind (Hyman & Mitchison, 1991). ATP-Mangel könnte deshalb zur Dysfunktion des Spindelapparates und dadurch zu chromosomalen Fehlverteilungen führen.

Mitochondriale Apoptoseinduktion :

Mitochondrien können außerdem Apoptose, den programmierten Zelltod, induzieren. Bei der Auslösung der Apoptose führen die pro-apoptotischen Signale zur Aktivierung einer Familie von Proteasen, sogenannten Caspasen (*cystein-specific aspartate proteases*). Diese Enzyme spielen sowohl bei der Weiterleitung des Apoptose-auslösenden Stimulus (Initiator-Caspasen) als auch bei der Auflösung der Zelle (Effektor-Caspasen) eine entscheidende Rolle. Man unterscheidet drei unterschiedliche Signalwege, den extrinsischen (*death receptor pathway*), den intrinsischen und den im endoplasmatischen Reticulum (ER) durch Stress aktivierten Signalweg, bei der es zu einer Calciumausschüttung aus dem ER kommt.

Der intrinsische, Typ II-Signalweg geht von den Mitochondrien aus (Newmeyer *et al.*, 1994). Bei seiner Aktivierung, u.a. durch reaktive Sauerstoffspezies, Calcium oder auch durch ATP-Absenkung, kommt es über verschiedene Mechanismen zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran und zu einer Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, u.a. Cytochrom c, aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma. Im Zytoplasma bindet Cytochrom c an ein bestimmtes Protein und aktiviert zusammen mit dATP die Caspase-9 und -3. Für den Ablauf der Apoptose wird ATP benötigt; bei starkem ATP-Mangel wird die Zelle nicht apoptotisch, sondern nekrotisch (Eguchi *et al.*, 1997). Auch der extrinsische Apoptoseweg kann die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien initiieren.

Beim intrinsischen Apoptose-Signalweg gibt es hauptsächlich zwei Mechanismen, die zur erhöhten Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran führen. Über die Öffnung von PT (*permeability transition*)-Poren in der inneren Mitochondrienmembran kommt es zunächst zu einer drastischen Verstärkung der Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran und somit zu einer Zerstörung des Membranpotentials (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Dies bewirkt eine Matrixschwellung, in deren Folge die äußere Membran rupturiert. Ein schneller Zusammenbruch des Potentials über der inneren Mitochondrienmembran führt zur Nekrose, ein protrahierter Potentialverlust zur Apoptose.

Ein zweiter Mechanismus basiert auf der Wirkung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bax und Bad, an der äußeren Mitochondrienmembran (Martinou *et al.*, 2001). Sie scheinen durch Kanal- oder Porenbildung die mitochondriale Membranpermeabilisierung zu provozieren. Cytochrom c und andere mitochondriale Faktoren werden frei, und die Caspasenkaskade wird in Gang gesetzt.

Bei Patienten mit MDS könnte mitochondriale Dysfunktion also prinzipiell die erhöhte Apoptoseneigung der Knochenmarkszellen erklären, die bereits als Ursache der ausgeprägten Ineffektivität der Hämatopoese identifiziert wurde.

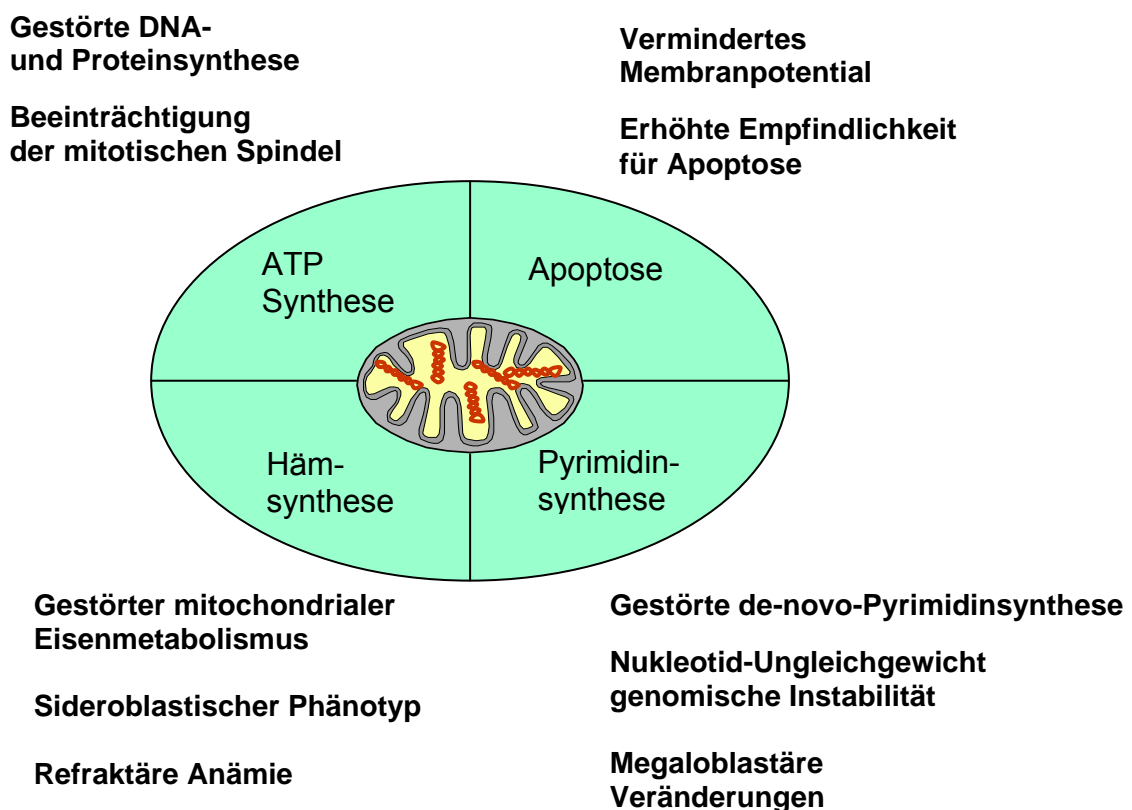


Abb. 1.6.: Mögliche Folgen einer mitochondrialen Dysfunktion im Knochenmark

1.7 Das mitochondriale Genom

Die mitochondriale DNA des Menschen ist eine ringförmige Doppelhelix aus 16569 Basenpaaren. Das mitochondriale Genom codiert 13 Proteine und darüber hinaus 22 tRNAs und zwei rRNAs, die für die Transkription der Proteingene erforderlich sind. Alle von der mtDNA kodierten Proteine sind Bestandteile der Atmungskette. Von den etwa 80 Untereinheiten, aus denen die Multienzymkomplexe der Atmungskette aufgebaut sind, werden die meisten durch nukleäre Gene kodiert. Sieben von ca. 40 Untereinheiten des Komplex I, 1 von 10 Untereinheiten des Komplex III, 3 von 13 Untereinheiten des Komplex IV und 2 von 12 Untereinheiten des Komplex V sind mitochondrial kodiert. Nur der Komplex II enthält keine mitochondrial kodierten Komponenten. Die Gene der mtDNA enthalten keine Introns. Durch die extreme Dichte der genetischen Information erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass Mutationen funktionelle Auswirkungen haben. MtDNA weist im Vergleich zur Kern-DNA eine etwa 10-fach höhere Mutationsrate auf (Brown *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1987). Dies hat wahrscheinlich mehrere Gründe. Verschiedene chemische Mutagene binden bevorzugt an mtDNA, möglicherweise weil diese nicht durch Histon-Proteine geschützt ist. Da die Reparaturmechanismen für mitochondriale DNA wesentlich weniger effizient als diejenigen im Zellkern sind, dürften Schäden der mtDNA häufig irreversibel sein. Der wichtigste Grund für die hohe Mutationsrate ist jedoch die unmittelbare Nähe der mtDNA zu den in großer Menge an der mitochondrialen Atmungskette gebildeten Sauerstoffradikalen, die zu oxidativen Schäden der mtDNA führen (Richter *et al.*, 1998).

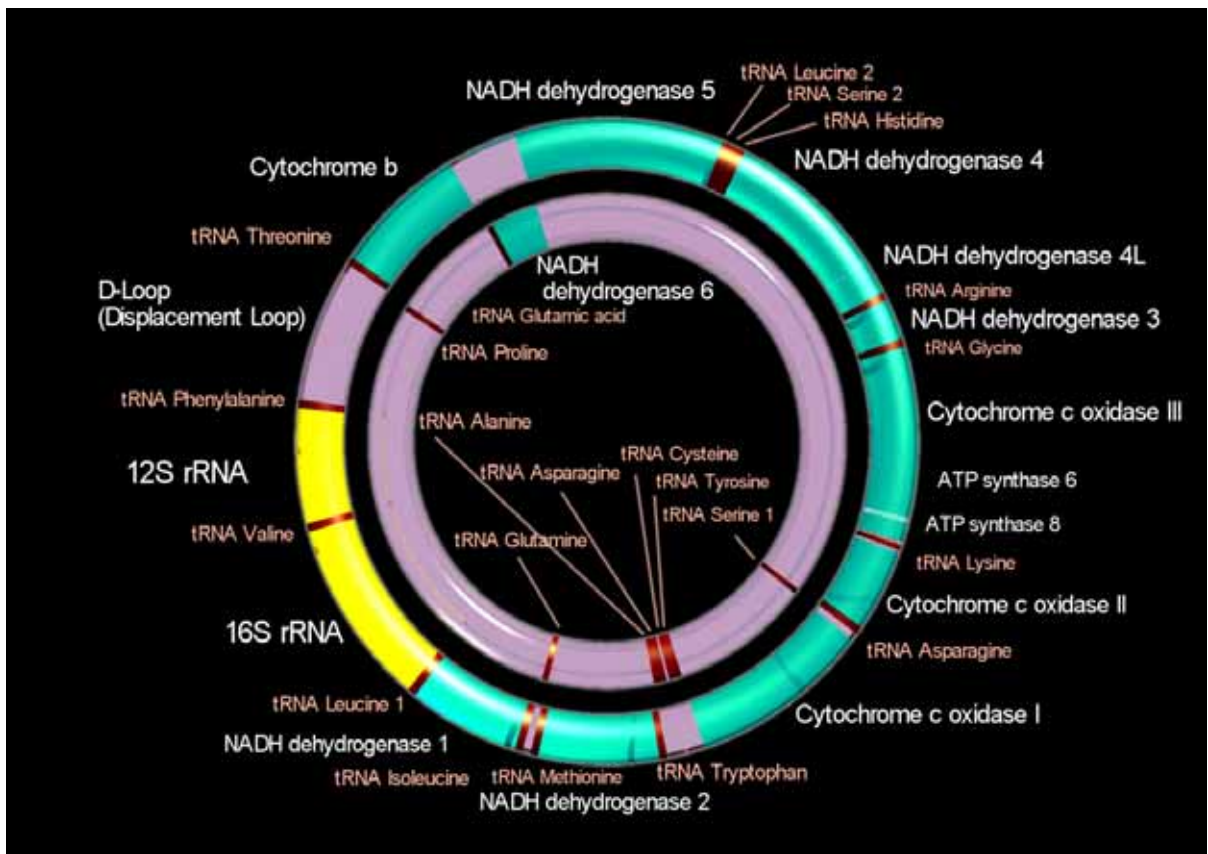


Abb. 1.7: Genkarte der menschlichen Mitochondrien-DNA
 aus: <http://www.cyanworks.net/archives/pe/img/mtDNA.png>

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, soweit erforderlich und erhältlich, die Reinheitsstufe pro analysi. Die Lösungen wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser, das aus destilliertem Wasser im Milli-Q System gewonnen wurde, (Millipore GmbH, Neu Isenburg) hergestellt, im Folgenden nur als H₂O bezeichnet.

- Antimycin A-Lösung, Lagerung bei < 0°C , lichtempfindlich
 - Ethanol
 - Fetales Rinder Serum von SIGMA (*Fetal Bovine Serum*, FBS), Lagerung bei < 0°C
 - Fetales Kälber Serum von SIGMA (*Fetal Calf Serum*, FCS), Lagerung bei < 0°C
 - HBSS-Puffer (*Hanks' Balanced Salts*) von SIGMA, Lagerung bei 2 bis 8°C
 - Diethylether, getrocknet, von Merck
 - Lymphoprepgradient von NYCOMED (Norwegen), Lagerung bei 2 bis 4°C
 - L-Glutamin von GIBCO™, Lagerung bei - 5°C bis - 20°C
 - Nichtessentielle Aminosäuren von GIBCO™, Lagerung bei 2°C bis 8°C
 - Natriumbicarbonat von SIGMA
 - Natronlauge
 - Natriumpyruvat von GIBCO™, Lagerung bei 2°C bis 8°C
 - PBS-Puffer
 - Penicillin-Streptomycin-Lösung von SIGMA, Lagerung bei -5°C bis -20°C
 - physiologische Kochsalzlösung
 - Rotenon, Pulverform, Lagerung bei Zimmertemperatur
 - RPMI Nährmedium von GIBCO™
 - Salzsäure
 - Trichloressigsäure von SIGMA Ultra, Fertig-Pulver Lagerung bei 2 bis 8°C
 - 0,4%-ige Trypanblau-Lösung, Lagerung bei 15°C bis 30°C
-

Vorbereitung von Atmungskettenblockern:

Rotenon:

In Pulverform, 394,4g/mol,

39,44 mg/100 ml = 1 mM

100 ml Ethanol und 40 mg Rotenonpulver wurden in ein 100 ml Gefäß gegeben und der Inhalt mit einem Rührfisch gemischt. Dieses Gefäß wurde für einen Tag in einem Becher mit lauwarmem Wasser auf dem Magnetrührer belassen, bis sich das Pulver löste.

Antimycin A:

Beim verwendeten Antimycin A handelte es sich um 40 µl einer 1 mM Antimycin A Ursprungslösung, die 1996 hergestellt und seitdem bei -20 °C gelagert worden war. Der O₂-Test am 04.07.2003 ergab eine gute Wirkung des Blockers (persönliche Mitteilung, Dr. Hofhaus, Biochemisches Institut der HHU). In den Kulturen verfärbte sich das lachsfarbene Nährmedium mit steigenden Blockerkonzentrationen über braungelb nach gelb. Dies war die Folge einer Übersäuerung des Nährmediums infolge der Atmungsketteninhibition. Die Wirksamkeit der Blocker wurde während unserer Experimente bestätigt. 5 µl einer mikromolaren Antimycin A- oder Rotenonlösung wurden zu 5 ml Nährmedium hinzupipettiert, um aus den vorgefertigten mikromolaren Blockerlösungen nanomolare Lösungen herzustellen. Die Inhibitorensuspensionen wurden 1 h vor Nutzung aus dem Kühlfach genommen und bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2.2 Untersuchungsmaterial

2.2.1 Zellkulturen aus Osteosarkomzellen und ihren ρ^0 -Transformanten

Die 143B-Zellen stammen von einer menschlichen Osteosarkomzelllinie, aus der die ρ^0 -Zellen gewonnen werden. ρ^0 -Zellen, die keine mitochondriale DNA mehr besitzen, sind das Ergebnis einer Behandlung der 143B-Zellen mit Ethidiumbromid (King & Attardi, 1989). Durch die Kultivierung von ρ^0 -Zellen mit fremden Mitochondrien lässt sich eine transmitochondriale Zelllinie herstellen (Hofhaus *et al.*, 1995). Diese Zellen (Tab.2.1) wurden uns von Dr. G. Hofhaus aus dem Institut für Biochemie an der HHU bereitgestellt.

Zellkulturen	Eigenschaften
Osteosarkomzellen 143B-Zellen ρ^0 -Zellen	Intakte Atmungskettenfunktion Kompletter Ausfall der Atmungskettenfunktion, besitzen keine mtDNA
ρ^0 -Transformanten C4T-Zellen LH5-Zellen LH53-Zellen	100% Ausfall der Komplex-I-Aktivität wegen einer Baseninsertion (C) in einem Gen der mt- DNA in Position 10947, das für die Untereinheit ND4 des Komplex I kodiert. 50% Ausfall der Komplex-I-Aktivität wegen einer Punktmutation in einem Gen der mtDNA in Position 11778, das für die Untereinheit ND4 des Komplex I kodiert. Guanin → Adenin Kein Ausfall der Komplex-I-Aktivität, Wildtyp mtDNA

Tab. 2.1: Verwendete Kulturzellen

2.2.2 Keratinozyten

Im Vergleich zu malignen Osteosarkomzellen wurden auch normale menschliche Zellen untersucht. Die Keratinozyten stammten von der Vorhaut (Präputium). Sie wurden in Keratinozytenmedium (Gibco, Germany) kultiviert. Das serumfreie spezielle Nährmedium wurde mit 50 µg/ml Hirnanhangsdrüsenextrakt vom Rind (BPE, *bovine pituitary extract*) und 5 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), 1% Penicillin, Streptomycin und 1% Glutamin versetzt. Die Kultivierung fand in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und befeuchteter Luft mit 5%-igem CO₂ statt. Danach wurden jeweils etwa 1x10⁵ Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 15 cm gebracht und regelmäßig unter dem Lichtmikroskop beobachtet bis die Zellen sich in reger Proliferation befanden. Diese Zellen wurden von Dr. M. Berneburg aus der Dermatologischen Klinik der HHU zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Mono-Mac-1-Zellen

Es wurden auch Untersuchungen mit einer Leukämiezelllinie, Mono-Mac-1, durchgeführt, um einen engeren Bezug zum Knochenmark zu gewinnen.

Die Mono-Mac-Mutterzelllinie wurde 1985 aus dem peripheren Blut eines 64jährigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie im Rezidiv gewonnen. Hieraus wurden die Schwesterklone Mono-Mac-6 und die monozytäre Leukämiezelllinie Mono-Mac-1 isoliert. Die Erkrankung entsprach dem FAB-Typ M5 und imponierte morphologisch durch ein monozytäres, bzw. monoblastisches Bild. Mono-Mac-1-Zellen besitzen einen nahezu diploiden Karyotyp und verschiedene chromosomale Veränderungen, unter anderem die Translokation (9;11), die bei der AML M5 mehrfach gefunden wurde. Immunologisch sind die Zellen CD13+, CD15+, CD34+, CD68+, HLA-DR+. Es handelt sich um eine Zelllinie mit deutlichen monozytischen Merkmalen, die möglicherweise über eine Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden hochreguliert wurden (Steube *et al.*, 1997). Die Zelllinie wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in 4 Ansätzen mit jeweils 0,3 Zellen / well einer 96er Platte. Während der Klonierungen und nach dem Auftauen wurde Penicillin/Streptomycin benutzt.

2.2.4 Knochenmark von Patienten mit AML, MDS

Um zu überprüfen, ob sich veränderte Nukleotidkonzentrationen auch in vivo finden lassen, wurden Knochenmarkzellen von Patienten mit MDS untersucht. Die Knochenmarkpunktionen wurden im Rahmen der primären Diagnostik oder bei Kontrolluntersuchungen zur Abschätzung des Krankheitsstadiums bzw. bei Remissionskontrollen nach vorhergehender Therapie durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial wurde aus dem Knochenmarkspirat spätestens 2 h nach der Beckenkammpunktion extrahiert (Tab.2.2).

Diagnosen	Anzahl der extrahierten KM Proben
Unauffälliger KM Befund	4
RA	4
RA 5q-	3
RARS	2
RAEB I	1
RAEB II	3
RAEB-T	1
sek.AML	6
AML M2	1
AML M3	1

Tab.2.2: Die zur Nukleotidextraktion verwendeten Knochenmarkproben

2.3 Laborgeräte

Zentrifugen:

Große Zentrifuge, Megafuge 1,0 R Heraeus Instruments, $r = 19,5 \text{ cm}$

Mikrozentrifuge, Eppendorf Tischzentrifuge, $r = 7,5 \text{ cm}$

Automatisierte Zellzählung mit dem Coulter Counter:

Jede Zellsuspension wurde mit einer Ansaugpipette 3x durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erzielen. Ein kleines Aliquot, etwa $200 \mu\text{l}$, wurde zur Zellzählung und zur mikroskopischen Kontrolle entnommen.

Da einige Zelltypen, wie Mono-Mac-Zellen, schnell sedimentieren und so infolge inhomogener Verteilung falsche Zellzahlen liefern können, wurde jedes Aliquot unmittelbar vor der Zellzählung noch einmal gründlich mit Hilfe eines Vortexgerätes durchmischt. Alle Zählungen erfolgten doppelt.

Die Zellzählung mit dem Coulter Counter basiert auf der Messung von Widerstandsänderungen, die von Teilchen hervorgerufen werden, die in einer leitfähigen Flüssigkeit suspendiert sind und durch eine Kapillaröffnung gezogen werden. Durch die Ansaugspritze des Gerätes werden etwa $12 \mu\text{l}$ Flüssigkeit angesaugt. Tritt eine Zelle in die Kapillaröffnung, ändert sich der Widerstand zwischen den im Elektrolyt eingetauchten zwei Elektroden und verursacht einen elektrischen Impuls. Die Anzahl der Impulse ergibt die Anzahl der gezählten Zellen, während die Impulshöhe proportional dem Zellvolumen ist. Die Zellgrößen der Zellen von 30 fl bis 450 fl werden in 256 Größenbereichen im Histogramm getrennt gezählt. Zellen zwischen 35 fl und 90 fl werden als Lymphozyten, zwischen 90 fl und 160 fl als Monozyten und zwischen 160 fl und 450 fl als Granulozyten bestimmt. Thrombozyten werden als solche im Volumenbereich von 2 fl bis 20 fl identifiziert. Dieser Bereich wird in 64 Größenabschnitte im Histogramm unterteilt.

Bestimmte störende Substanzen können zu Fehlergebnissen führen. Ungewöhnliche Erythrozytenabnormitäten, die sich nicht lysieren lassen, kernhaltige rote Blutkörperchen, fragmentierte Leukozyten, oder sehr große oder aggregierte Thrombozyten, wie sie bei der Verwendung von Oxalat oder Heparin als Antikoagulanzen auftreten, können zu falschen Histogrammen führen. Auch Thrombozytenfragmente oder einfach nur Zelltrümmer nahe

dem unteren Grenzwert können durch Konglomeratbildung fälschlich als größere Zellen gemessen werden. Histogramme können wichtige Hinweise bezüglich der Zellvitalität geben. Ein gutes Wachstum zeigt sich im Leukozyten-Histogramm durch einen breiten Peak bei 200 fl und ohne „Thrombozyten“. Eine Tendenz des Graphen nach links im Leukozyten-Histogramm zeigt an, dass das Zellvolumen abnimmt. Dies ging im allgemeinen auch mit mikroskopisch festgestelltem schlechtem Zellwachstum einher, sei es durch Kontamination, durch Nährstoffmangel oder Lactatazidose bedingt. Wichtig zu nennen ist hierbei noch, dass die alleinige Bestimmung der Gesamtzellzahl nichts über die Qualität und über den Zustand der Zelle aussagt. Es werden auch tote Zellen gezählt, und es sollte zusätzlich zur Histogrammanalyse eine Trypanblaufärbung erfolgen, um den Anteil vitaler Zellen zu bestimmen.

LEU	4,8	$\times 10^3/\mu\text{L}$	Grenzwerte Nr=1	4,0- 11,0	ERY	5,40	$\times 10^6/\mu\text{L}$	Grenzwerte Nr=1	3,90- 5,60	THR	221,	$\times 10^3/\mu\text{L}$	Grenzwerte Nr=1	150,-400,
LY%	41,7	%		25,0-40,0	HGB	15,4	g/dL		12,1-17,2	MTV	5,1	L	FL	7,4-10,4
MD%	6,9	%		2,0- 8,0	HKT	43,6	%		37,0-50,0	TXT	.135	%		.000-.999
GR%	51,4	%		50,0-75,0	MCV	91,8	fL		84,0- 98,0	TVB	17,0			0,0-99,9
LY#	2,0	$\times 10^3/\mu\text{L}$		0,0- 99,9	MCH	30,4	pg		28,0-34,0					
MD#	0,3	$\times 10^3/\mu\text{L}$		0,0- 99,9	MCHC	33,2	g/dL		32,0-36,0					
GR#	2,5	$\times 10^3/\mu\text{L}$		0,0- 99,9	EV8	12,4	%		11,5-13,7					

Proben-ID-Nr: 1

Datum und Uhrzeit der Analyse: 17-01-02 12:36

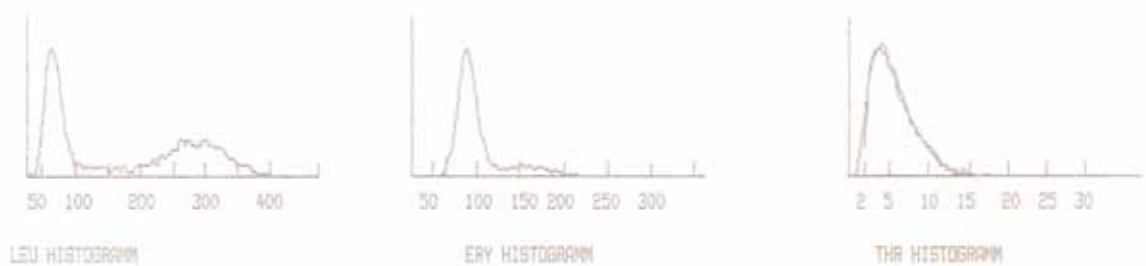


Abb. 2.1: Histogramm aus der Blutprobe eines gesunden Probanden. Die Ordinate gibt die Zellkonzentration, die Abszisse das Zellvolumen an. Im Leukozytenhistogramm fällt der typische „Lymphozytenpeak“ bei 50 - 100 fl und der „Granulozytenbuckel“ bei 200 bis 400 fl auf.

2.3.1 Vitalitätsprüfung mit Trypanblau

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der an Proteine bindet. Die Bindung ist abhängig vom pH-Wert (Optimum pH 7,5) und von der Einwirkzeit. Die Aufnahme des Farbstoffes erfolgt selektiv in Zellen mit geschädigter Zellmembran. Durch das Mikroskopieren der Zellen war es möglich, Form, Größe und andere optisch erkennbare Eigenschaften der Zellen zu beurteilen. Es wurden 60-70 µl einer Zellsuspension mit 15 µl Trypanblau inkubiert. Unter dem Mikroskop lassen sich dann tote Zellen durch Blaufärbung erkennen.

2.4 Extraktion der Nukleotide

An allen Zellen wurde der gleiche Aufreinigungs- und Extraktionsvorgang durchgeführt. Aus Knochenmarksproben wurden mit dem Lymphoprep-Gradienten erst die mononukleären Zellen separiert, bei denen es sich hauptsächlich um Lymphozyten, Monozyten und hämatopoetische Vorläuferzellen handelt. Später wurden aus diesen Zellen die Nukleotide extrahiert. Diese Methode der Zellauftrennung wurde auch bei der Kultivierung von Leukämiezellen dazu genutzt, weitgehend intakte Zellen zu sammeln und zu untersuchen. Abgestorbene Zellen können in Bruchstücke zerfallen und bei der Zellzählung ein Problem darstellen. Hinzu kommt die Feststellung, dass die von Leukämiepatienten gewonnenen Materialien eine beträchtliche Zahl von zugrundegegangenen Zellen enthielten, die die Nukleotidanalysen wegen erniedrigter ATP/ADP Quotienten stören können (De Korte *et al.*, 1984). Die Lymphoprep-Methode ist bei der Sammlung apoptotischer Zellen kritisch zu betrachten, weil ein Großteil dieser Zellen offenbar ins Sediment wandert und deshalb verworfen wird (Raza *et al.*, 2000).

Lösungen:

HBSS-Puffer, pH 7,4:

900 ml H₂O wurden in einem 1 l Gefäß mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Dann wurden HBSS Fertig-Pulver und 0,35 g Na₂CO₃ hinzugegeben und kräftig geschüttelt, bis sich alle Teilchen auflösten. Anschließend wurde der pH des Puffers mit ca. 3 ml Salzsäure auf den gewünschten Wert von pH 7,4 eingestellt und gegebenenfalls mit NaOH nachjustiert. Die Flasche wurde mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und geschüttelt, bis sich alles auflöste.

HBSS Fertig-Pulver (ohne Na-bicarbonat und Phenolrot) enthält:

CaCl	0,14 g/L
MgSO ₄	0,098 g/L
KCl	0,4 g/L
KH ₂ PO ₄	0,06 g/L
NaCl	0,0 g/L
Na ₂ HPO ₄	0,048 g/L
D-Glukose	1,0 g/L

Der HBSS Puffer dient bei der Waschung dazu, den pH und das osmotische Gleichgewicht konstant zu halten und die Zellen mit Wasser, essentiellen Ionen und Glucose zu versorgen.

Lymphoprep-Dichtegradient, Fertigprodukt:

Natriummetrizoat 9,6% (w/v)

Polysaccharid 5,6% (w/v)

Dichte: $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$

Osmolalität: 280 ± 15 milliosmolar

10% Trichloressigsäure (TCA):

2 g in 10 ml H₂O gelöst:

Die TCA-Lösung wurde immer aus der frischen pulverisierten Form und reinem (Milli-Q) Wasser hergestellt und für die spätere Verwendung jeweils 200 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und im Kühlfach bei -20 °C gelagert. Verunreinigungen in Leitungswasser oder nicht ausreichend destilliertem Wasser können zu störenden Peaks („dirt peaks“) in den HPLC-Ergebnissen führen.

Wassergesättigter Diethylether:

Diethylether (C₂H₅)₂O:

molare Masse = 74,12 g/mol

Reinheitsgrad: getrocknet

H₂O-gesättigter Diethylether wird zur Entfernung der TCA am Ende der Nukleotidextraktion gebraucht. Für seine Herstellung wird Diethylether (Reinheitsgrad: getrocknet) mit speziell aufgereinigtem Wasser vermischt, um Verunreinigungen auszuschließen. Es bilden sich nach dem Vermischen 2 Phasen. In der oberen Phase befindet sich der gesättigte Ether, in der unteren das Wasser. Der Ether ist jetzt mit so viel Wasser gesättigt, dass sich kein weiteres Wasser mehr in ihm lösen wird.

Die untere Phase enthält am Ende der Extraktion die TCA-Lösung mit den Nukleotiden. Da sich TCA in Ether besser löst als Wasser, wandert sie in den Ether und kann im Sonderabfall verworfen werden. Im Falle eines trockenen Ethers würde sich nicht nur die TCA, sondern auch Wasser in dem Ether lösen und das Volumen des Zellextraktes verkleinern. Zur TCA-Entfernung wurde das dreifache Volumen an wassergesättigtem Ether verwendet.

2.4.1 LymphoprepTM-Separation

Die Auftrennung der mononukleären Zellen (MNC) erfolgte nach dem Prinzip des Dichtegradienten von Böyum (Böyum *et al.*, 1968). Die Erythrozyten sinken aufgrund ihrer hohen Dichte durch das Lymphoprep, während sich die weniger dichten mononukleären Zellen als weißlich trübe erscheinende Schicht in der Interphase zwischen Plasma und Gradientenflüssigkeit befinden. Die Granulozyten werden von den roten Blutkörperchen ins Sediment mitgerissen. Bei MDS-Knochenmarksproben wurden auch apoptotische Zellen vermehrt im Sediment gefunden (Raza *et al.*, 2000). Die zur Separation verwendeten Proben, mit Zitrat oder Heparin vermisches Knochenmark, wurden bei größeren Mengen ab 10 ml in Aliquots aufgeteilt. Bei sehr zellreichen Proben, die von Patienten mit AML gewonnen wurden, konnte man kleine Verklumpungen durch Filtern des Materials mit einem Falcon-Zellsieb mit 40 µm Poren entfernen. In diesen Fällen bot sich eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 mit HBSS-Puffer an. Nachfolgend wurden zwei 25 ml Zentrifugationsröhrchen mit jeweils 8 ml Gradientenflüssigkeit (Lymphoprep) gefüllt und mit den Proben vorsichtig überschichtet, so dass zwei Phasen bestehen blieben. Kurze Zeit später sah man Erythrozytenklumpen zu Boden sinken. Diese imponierten als roter Niederschlag. Die Erythrozyten verklumpen durch das Ficoll (ein nichtionisches, synthetisches Sucrosepolymer) im Lymphoprep (Abb.2.2).

Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 1500 min⁻¹ für 30 min (4800 g bei R = 19,5cm).

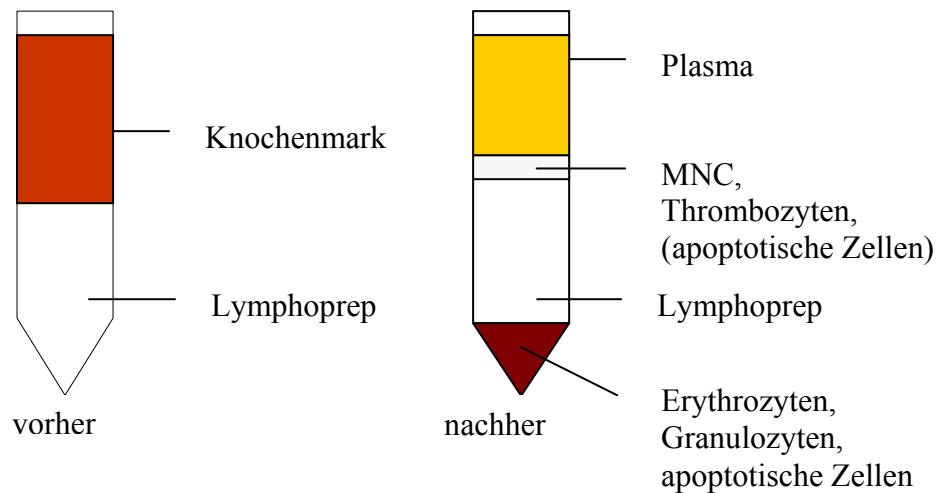


Abb. 2.2: Lymphepräparation vor und nach der Zentrifugation

Die weiße Schicht wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in ein neues Röhrchen überführt und dieses mit HBSS-Puffer aufgefüllt. Das Eintauchen der Pipettenöffnung in den Gradienten wurde vermieden, um keine Erythrozyten oder Granulozyten mitzunehmen. In der Regel wurde ein großer Teil des Plasmas und etwas Lymphoprep mit abgesaugt, das später herausgewaschen wurde. Zum Pelletieren der MNCs erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation der Suspension bei 1500 min^{-1} und das Abdekantieren des Überstandes, in dem sich auch zum großen Teil die Thrombozyten befanden. Eine Kontamination der MNC mit Thrombozyten und Erythrozyten kann zur Beeinflussung der Nukleotidkonzentrationen führen (Korte *et al.*, 1985). Das Pellet wurde in 1 ml HBSS-Puffer resuspendiert, aus dem ein $40 \mu\text{l}$ Aliquot für die 1. Zellzahlmessung mit dem Coulter Counter entnommen wurde. Die Suspension wurde mit HBSS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und noch zweimal gewaschen.

2.4.2 Aufbereitung der Zellen für die Extraktion

Alle Zellen wurden vor der Extraktion gewaschen, um Verunreinigungen im Nukleotidextrakt zu verhindern. Nicht korrekt gereinigte Proben fielen mit „dirt peaks“ bei der HPLC auf. Dabei handelt es sich um Zellbestandteile, die die Peaks der Nukleosidphosphate, besonders der Cytidine, und der UDP-Zucker überlagern und somit die Ergebnisauswertung behindern. Durch eine zu intensive Waschung mit mehreren Zentrifugationsschritten wiederum besteht die Möglichkeit, die Zellen zu schädigen. Besonders die Dauer der Aufreinigung spielt eine große Rolle, da ab 2 Stunden nach

Knochenmarkpunktion das Zellpellet sich als eine nicht mehr resuspendierbare Masse darstellt. Aus den beschädigten bzw. abgestorbenen Zellen wird DNA freigesetzt, die wie Klebstoff wirkt. Die Knochenmarksproben wurden nach Punktion zügig gewaschen und extrahiert, auch deshalb weil bei heparinisierten Proben ein ATP-Zerfall schon nach 45 min eintreten kann. Knochenmarksproben unter EDTA halten länger.

Folgende Waschprozedur hat sich bei allen bereits erwähnten Zellen als geeignet erwiesen (Abb. 2.3):

Die gewonnenen Zellen wurden in 25 ml Universal-Röhrchen überführt und mit HBSS-Puffer aufgefüllt. Es wurde darauf geachtet, dass der HBSS-Puffer auf Raumtemperatur gebracht wurde, damit die Zellen keinen Kälteschock erlitten. Das Auffüllen der Gefäße mit HBSS-Puffer, bzw. das Verdünnen der Zellsuspension beendete die Inkubationszeit mit Atmungskettenblockern bei diesen Experimenten. Die erste Zählung war besonders wichtig, weil anhand der Histogramme festgestellt werden konnte, ob es sich bei der Probe hauptsächlich um Zellen oder Debris handelte und ob eine genügende Zellzahl für die Extraktion am Ende des Waschganges zur Verfügung stehen würde. Bei einem kompletten Waschgang konnte es zu einem 60%igen Zellverlust kommen. Nach Protokoll (Dr. Simmonds, London) wurden für die Extraktion mindestens eine Million Zellen vorbereitet. Das Universal-Röhrchen mit dem resuspendierten Pellet Nr. 1 wurde mit HBSS-Puffer aufgefüllt und 5 min bei 1500 min^{-1} bei 500 g zentrifugiert. Nach dieser ersten Waschung wurde das Pellet Nr. 2 mit HBSS resuspendiert und das Gefäß ohne Entnahme eines Aliquots mit HBSS aufgefüllt. Bei der zweiten Waschung wurde nach einer wiederholten Zentrifugation das Pellet Nr. 3 nun in 1 ml HBSS resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß übertragen. Aus der 1 ml Suspension wurde ein $40 \mu\text{l}$ -Aliquot entnommen und die entscheidende Zellzahl vor der Extraktion gemessen. Mit dieser Zellzahl ließen sich die gemessenen Nukleotidkonzentrationen auf einen Wert pro Zelle umrechnen. Es folgte erneut eine diesmal 10 minütige Zentrifugation bei 1500 min^{-1} in der Mikrozentrifuge. Nach Erhalt des weichen Pellets Nr. 4, wurde der Überstand dekantiert. Die Restflüssigkeit wurde mit Zellstoff an der Gefäßöffnung aufgesaugt.

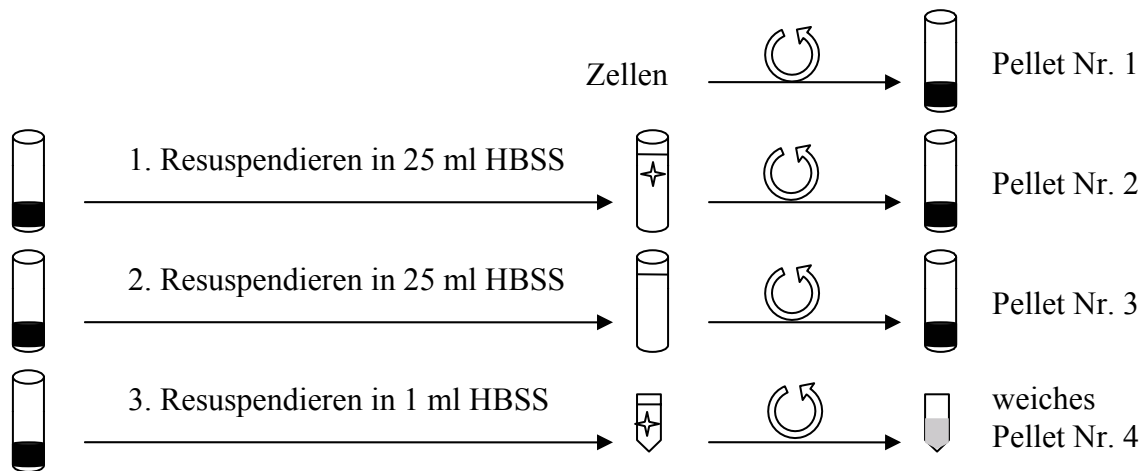




Abb. 2.3: Zellwaschung nach Lymphoprep, Zentrifugation =  Zellzählung = 

2.4.3 Zellyse und Extraktion der Nukleotide nach Simmonds *et al.* (1991)

Das Eppendorfgefäß mit dem weichen Pellet Nr. 4 wurde mit 200 µl 10%iger TCA Lösung gefüllt und der gesamte Inhalt energisch mit dem Vortexer gemischt. Die TCA lysiert die Zellen und führt zur Denaturierung der Proteine. Beim Vermischen des Eppendorfenthaltes mit dem Vortexer und beim nachfolgenden Zentrifugieren bei 13000 g für 1 min in der Mikrozentrifuge werden die Zellen mechanisch auseinandergerissen und alle Zellpartikel sedimentieren fest an der Spitze des 1,5 ml Gefäßes. Danach wurde der Überstand, worin sich die Nukleotide und TCA befinden, mit einer Pipette in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Gefäß mit dem Pellet aus Zelldebris, verworfen. Die TCA wurde mit H₂O-gesättigtem Diethylether in etwa sechs bis acht Extraktionen entfernt, bis der pH-Wert des Ethers, gemessen mit pH Messstreifen, auf 5,0 anstieg. Dabei ließ sich die gut erkennbare obere Phase, in der sich die TCA löste, mit einer Pipette aufsaugen und als Sondermüll entsorgen.

Schließlich wurden mögliche Etherreste in der Probe 5 - 10 min zum Verdampfen stehen gelassen, eventuell erfolgte noch ein letztes Mal die Zentrifugation der Extrakte, um eventuell vorhandene DNA zu entfernen, die durch TCA gefällt worden war. Schließlich wurden die Proben bei -20 °C im Kühlfach gelagert. Die Nukleotidproben wurden zur Konzentrationsbestimmung mittels HPLC-Messung auf Trockeneis in das Labor von Dr. Simmonds nach London gesandt. Wichtig war es, die Extraktion so schnell wie möglich durchzuführen, weil einige Nukleotide in der Trichloressigsäure-Lösung instabil sind.

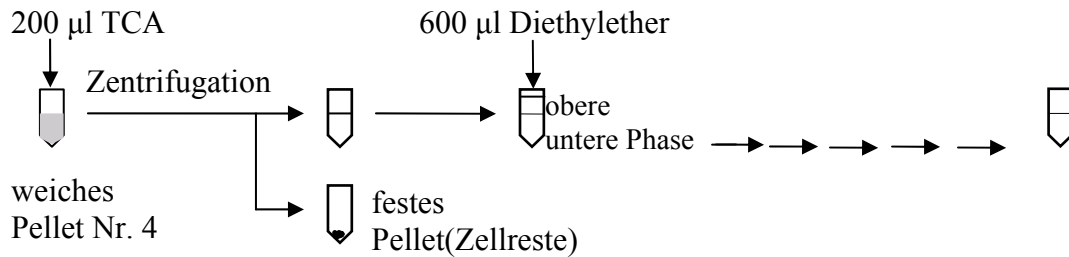


Abb. 2.4: Etherextraktion

2.5 Kultivierung der Mono-Mac-1-Zellen

2.5.1 Herstellung des Nährmediums:

- 500 ml RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin, ohne HEPES, mit Phenolrot
- 55 ml FBS oder FCS (10% des Gesamtvolumens)

Weitere Zusätze:

- 5,5 ml L-Glutamin 200 mM (100X), flüssig
- 5,5 ml Nichtessentielle Aminosäure Lösung 100X, ohne L-Glutamin, flüssig
- 5,5 ml Na-Pyruvat MEM 100mM, flüssig
- 5,6 ml Penicillin-Streptomycin-Solution 10×10^3 units Penicillin und 10mg Streptomycin/ml in 0,9% NaCl

Alle aufgeführten Inhaltsstoffe wurden vor der Nutzung auf Zimmertemperatur gebracht. Das restliche Nährmedium wurde im Kühlraum gelagert. Das Ansetzen sowohl der Zellen als auch des Nährmediums wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Weitere Medien:

- Auftaumedium:
 - 50% RPMI 1640 Medium, mit Phenolrot, mit 25MM-HEPES-Puffer, ohne L-Glutamin
 - 50% FCS

2.5.2 Dialyse des verwendeten Serums nach Simmonds

Bei der Dialyse macht man sich das Phänomen der Diffusion zunutze, bei der sich ein gelöstes Teilchen infolge der Brown-Molekularbewegung zum Ort seiner niedrigeren Konzentration bewegt. Das Ziel der Dialyse war, das Serum von Nukleosiden zu reinigen und Moleküle mit größerem Molekulargewicht mit Hilfe der semipermeablen Membran im Dialyseschlauch zu behalten, die für die Zellfunktion wichtig sein konnten.

Es wurde ein Dialyseschlauch von SIGMA-Aldrich, mit 9 mm Durchmesser, zum Ausschluss von Molekülen mit einem molekularen Gewicht von 1200 Dalton verwendet. Die Dialysemembran enthält mikroskopische zellulosebeschichtete, benzylierte Poren, die Teilchen bis zu einem Molekulargewicht von 1200 g/mol auftrennen. Ein Dialyseschlauch wurde für wenige Minuten in einem Gefäß mit 2 l NaCl eingeweicht und an einem Ende zugeknotet. Nachdem über das andere Ende die gewünschte Menge an Serum hineingegossen war, wurde er geschlossen. Anschließend wurde der gefüllte Schlauch in das Gefäß mit Kochsalzlösung gelegt und für 12 h in einen Kühlraum mit 15 °C gestellt. Dann wurde die Kochsalzlösung gewechselt und erneut für mindestens weitere 6 Stunden ruhen gelassen. Später erfolgte die sterile Überführung der dialysierten Flüssigkeit im Schlauch in ein reines Gefäß.

2.5.3 Nährmediumwechsel

Grundsätzlich wurde ein Nährmediumwechsel an der Sterilbank (Lamina-air-flow) durchgeführt. Vor jedem Mediumwechsel wurde die Zellkonzentration in der Kultur mit dem Coulter bestimmt, um zu sehen, ob die Zellen dicht gewachsen waren. Die anfänglich ausgesetzte Zellzahl spielte eine wesentliche Rolle für das Wachstum der Zellen. Wurden die Zellen zu dünn ausgesät, wuchsen sie nur sehr schlecht. Zu dicht ausgesäte Zellen mussten hingegen zu oft subkultiviert werden, wobei durch die ständige Störung des Milieus das Wachstum behindert werden kann. Bei einer Zelldichte $< 2 \times 10^3 / \mu\text{l}$ wurde deshalb kein frisches Nährmedium hinzugeben. Im Falle einer Gelbverfärbung des Mediums wurde das alte saure Medium nach Abzentrifugieren durch frisches Nährmedium ersetzt. Bei guter Proliferation erfolgte die Subkultivierung der Hälfte der Zellsuspension und das Auffüllen mit Nährmedium auf das Ursprungsvolumen. Die nötige Anzahl an Aliquots mit Nährmedium wurde auf Zimmertemperatur gebracht. Kulturgefäße aus dem Inkubationsschrank wurden direkt unter die Sterilbank gestellt. Nach Nährmediumzugabe

wurden die Zellsuspensionen durchmischt und ein kleines Restvolumen in der Pipettenspitze zur Zellzählung mit dem Coulter in ein Eppendorfgesäß übertragen. Zellsuspensionen wurden aus vier Kulturflaschen mit einer elektronischen Pipette jeweils in 4 Röhren übertragen und gezählt. Für den Tag der Blockerzugabe wurden mehr als 140×10^6 Zellen für 14 Ansätze geplant. Zur Inhibitorenzugabe wurden die Ansätze bei 1500 min^{-1} für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Pellets wurden mit insgesamt max. 60 ml Nährmedium, mit dialysiertem FCS oder FBS, resuspendiert und eine Konzentration von 2×10^3 Zellen / μl eingestellt. Alle vier Suspensionen wurden in ein 100 ml Glasgefäß gegeben und nach Konzentrationsanpassung wieder gezählt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspensionen im Glasgefäß gut durchmischt waren, weil die Zellen sehr schnell sedimentierten. Schließlich erfolgte die Verteilung der Gesamtkultur auf 14 Zellkulturflaschen (20 ml) jeweils 5 μl einer mikromolaren Blockerkonzentration wurden unter Schwenken der Flasche hinzugegeben. Die Reihenfolge und Zeit der Inhibitorenzugabe wurde notiert. Danach wurden die Zellzahlen in einer Doppelbestimmung mit dem Coulter ermittelt und die Zellen für die geplante Zeit im Inkubationsschrank belassen. Die Deckel wurden nur lose aufgebracht, um einen Gasaustausch der Zellen zu gewährleisten.

Vorbereitung zur dNTP-Extraktion:

Am nächsten Tag wurde der Inhalt von 12 Kulturflaschen mit 12x5 ml Pipettenspitzen in 12 Universal-Röhren übertragen, dabei wurde jeweils ein geringes Aliquot für die Zellzählung abgenommen und in Eppendorfgesäße überführt. Die Röhren wurden zur selben Uhrzeit wie am Tag der Blockerzugabe mit HBSS-Puffer aufgefüllt, um die mit Atmungskettenblockern behandelten Zellsuspensionen zu verdünnen und die Behandlung der Zellen zu beenden. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1500 min^{-1} und das Dekantieren des Überstandes. Hiernach fanden die Aufreinigung der Ansätze und anschließend die Nukleotidextraktion statt.

2.5.4 Kulturansatz

Insgesamt wurden 14 Zellansätze zu je 5ml Volumen vorgenommen. Jede Zellsuspension bestand aus 10×10^6 Zellen und vorgefertigtem Nährmedium. Dafür war eine Gesamtzellzahl von 140×10^6 Zellen unter Berücksichtigung der Verluste erforderlich. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 5% CO_2 . Die Zellzahl pro Ansatz wurde so gewählt, dass unmittelbar vor Beginn der Extraktion mindestens noch 1×10^6 Zellen zur Verfügung standen. Da während der Blockerbehandlungen und bei den Waschungen Zellen verloren gingen,

wurden etwa 10×10^6 Zellen pro Ansatz vorbereitet. Jedes Röhrchen mit Zellen benötigte zum Auftauen ein spezielles Auftaumedium, das vorher auf 37°C vorgewärmt wurde. Pro Volumen an Zellen, das aufgetaut wurde, wurde das Zehnfache an Auftaumedium benötigt. Das Auftaumedium, das den Wärmeschock durch schnelles Auftauen verhindert, wurde im 10 ml Gefäß je Probe im heißen Becher aufgetaut und in ein Universal-Röhrchen gegeben. Die Mono-Mac-1-Zellen waren zu 2 ml Aliquots bei -80°C gelagert. Das Auftauen der Proben erfolgte unter fließend heißem Wasser. Sobald sie flüssig wurden, konnten sie in jeweils 2 Röhrchen mit Auftaumedium gegeben werden, ohne dabei Gefäßränder gegenseitig in Berührung zu bringen. Die Röhrchen (Auftaumedium + Probe) wurden bei 1500 min^{-1} 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zum Auswaschen des Auftaumediums wurde das Pellet jeweils mit 5 ml PBS resuspendiert und mit PBS aufgefüllt und wieder bei 1500 min^{-1} 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit 7 ml Nährmedium resuspendiert. Dabei fand eine 5 ml Ansaugpipettenspitze Verwendung, indem dreimal hin und her aspiriert und das Resuspendat zügig in das Kulturgefäß übertragen und beide Gefäße in den Brutschrank gelegt wurden. Die Deckel wurden lose an der Öffnung angebracht, um den Zellen das Atmen zu ermöglichen. Sieben Tage nach Ansetzen der Zellen erfolgte die erste Kontrolle.

2.6 Bestimmung der zellulären Nukleotidkonzentrationen mittels Anionen-Austausch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde für die Auftrennung und Quantifizierung von Nukleotiden aus speziell vorbehandelten mononukleären Zellen verwendet. Dabei wurden 5 - 125 μl eines Extraktes, meistens im zweifachen Ansatz, in eine HPLC mit Anion-Austauscher Säule injiziert und damit die Nukleotide aufgetrennt (nach Simmonds *et al.*, 1991). Die Separation erfolgte durch ein Elutions-System, bei dem zwei verschiedene Gradientenpuffer mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml / min eine kontinuierliche Veränderung in der Zusammensetzung der mobilen Phase ermöglichten. Dies war die Voraussetzung dafür, dass der erste Puffer bestimmte Komponenten aus dem Extrakt leichter eluieren konnte. Im Laufe der Messung ermöglichte der zweite Puffer die leichtere Elution der verzögert erscheinenden restlichen Komponenten, die schneller detektierbar wurden. Somit war es möglich, innerhalb der maximal 30-minütigen Retentionszeit breitere HPLC-Spuren und Überlappungen im Chromatogramm zu vermeiden. Zur Identifizierung der verschiedenen Peaks wurden die Retentionszeiten der jeweiligen Zellextrakte mit

bekannten Kontrollnukleotiden verglichen und die Koordinaten der x-Achse ermittelt. Mit Hilfe eines UV-Detektors wurde die Absorption des UV-Lichtes bei Wellenlängen um 254 nm und 280 nm registriert und die Chromatographiespur aufgezeichnet, wonach die Konzentration der Bestandteile in der Säule ermittelt wurde.

3 Ergebnisse

Wegen der Vermutung, dass mitochondriale Defekte sich durch funktionelle Beeinträchtigung der DHODH auf die de-novo-Pyrimidinsynthese auswirken und dadurch eine Imbalance der Nukleotidkonzentrationen mit konsekutiver genetischer Instabilität hervorrufen können, wurden aus verschiedenen Zellen mit gestörter Atmungskettenaktivität Nukleotide extrahiert, um deren Konzentrationen zu ermitteln.

Hierfür wurden zum Beispiel rho-0-Zellen verwendet, die wegen kompletten Fehlens der mtDNA keine funktionierende Atmungskette besitzen. Weiterhin wurden Zellen mit mtDNA-Mutationen untersucht, die zu einer Absenkung der Atmungskettenaktivität führen. Außerdem wurden Zellen mit spezifischen Atmungsketteninhibitoren behandelt. Schließlich wurden die Nukleotidkonzentrationen auch in nativen Knochenmarkzellen von Patienten mit MDS und Leukämie analysiert und mit den Zellkulturergebnissen verglichen.

Die Ergebnisse der Nukleotidmessungen zeigten, dass die NAD-Konzentration pro Zelle in den Proben weitgehend stabil blieb (Abb. 3.1). Bei einem NAD-Abbau wäre der ADPRP (ADP-Ribosephosphat)-Spiegel angestiegen, was nicht der Fall war. Deshalb sind die Konzentrationsangaben ($\text{pmol}/10^6$ Zellen) auf NAD normiert worden, ($[\text{dNTP}] / [\text{NAD}]$), um mögliche Fehler bei der Zellzahlbestimmung auszugleichen. Von jeder Probe wurden zwei HPLC-Messungen durchgeführt, deren Durchschnittswert für die Diagramme verwendet wurde (Originaltabellen im Anhang).

Da die Cytidinmonophosphat (CMP)- und CDPE-Gipfel wegen ähnlicher Retentionszeiten stark mit anderen Nukleotid-Abbauprodukten überlappten, war es nicht möglich, die CMP-Spiegel sicher zu bestimmen (Dr. Simmonds, London, persönliche Mitteilung). Deshalb wurden CMP-Werte nicht in die Auswertung der Experimente einbezogen.

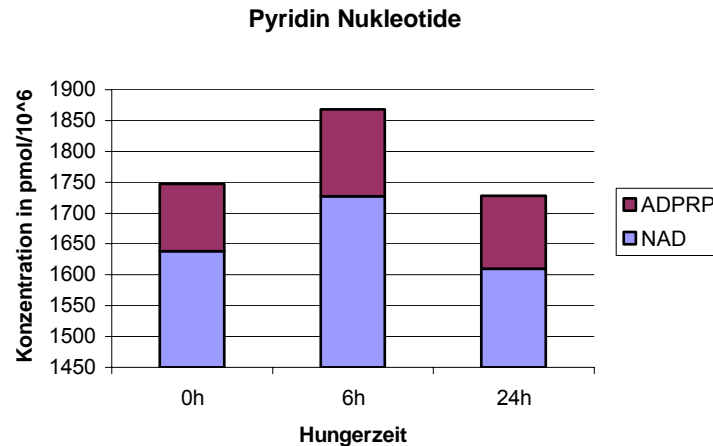


Abb. 3.1: Die absolute NAD Konzentration blieb vom Uridinentzug der Osteosarkomzellen nach 0h, 6h und 24h unbeeinflusst.

3.1 ρ^0 -Zellen in der Uridinmangelsituation

ρ^0 -Zellen, die keine mitochondriale DNA mehr besitzen, sind das Ergebnis einer langwierigen Behandlung der 143B-Zellen mit Ethidiumbromid (King, M.P. *et al.*, 1989). Dieser kanzerogene Stoff interkaliert in die mitochondriale DNA und verändert die Geometrie der ringförmigen Doppelhelix. Die DNA-Polymerase kann an der mtDNA nicht mehr binden und die Replikation nicht beginnen. Bei jeder Verdopplung der Zelle wird das mitochondriale Genom ausgedünnt, so dass sich nach und nach während der Replikation Zellen bilden, die keine mtDNA mehr aufweisen und keine intakte Atmungskette betreiben können. Unter diesen Umständen sind die Zellen für ihr Wachstum auf die Zuführung eines Ribonukleosids, z.B. auf Uridin, angewiesen, da die Atmungskette auch für die Pyrimidinneusynthese notwendig ist. Wir ließen die ρ^0 -Zellen für 6 h und 24 h ohne Uridin wachsen, um zu sehen, wie sich die Nukleotidkonzentrationen veränderten. Nachdem die ρ^0 -Zellen in Uridin kultiviert worden waren, fand für 24 h kein Nährmediumwechsel und in einem weiteren Ansatz für die letzten 6 h ein Nährmediumwechsel ohne Uridin statt, um die Veränderungen der Nukleotidkonzentrationen zu bestimmen.

Der Uridinmangel über 6 h und 24 h führte bezogen auf Purinnukleotide zu keinen auffälligen Veränderungen an der Gesamtkonzentration der Mono-, Di- und Triphosphate, ob mit oder ohne 24 h Uridininkubation (Abb. 3.2). Alle Uridin- und Cytidinphosphatstufen sanken kontinuierlich nach 6 h und 24 h Uridinhunger im Vergleich zur Kontrolle mit

Uridinversorgung für 24 h ab. Das Fehlen der Atmungskette in diesen Zellen führte also zu einem deutlichen Verlust der Pyrimidinnukleotide. Die Zellen können ohne Uridin nicht wachsen. Auch hier fiel auf, dass die Monophosphatkonzentrationen der Uridine, wie bei den Monophosphaten der Purine zur Zeit 0 h, schon erhöht vorlagen. Die Pyrimidin-Zucker nahmen mit der Zeit des Uridinentzugs ebenfalls ab wie die Pyrimidinnukleotide (Abb. 3.3).

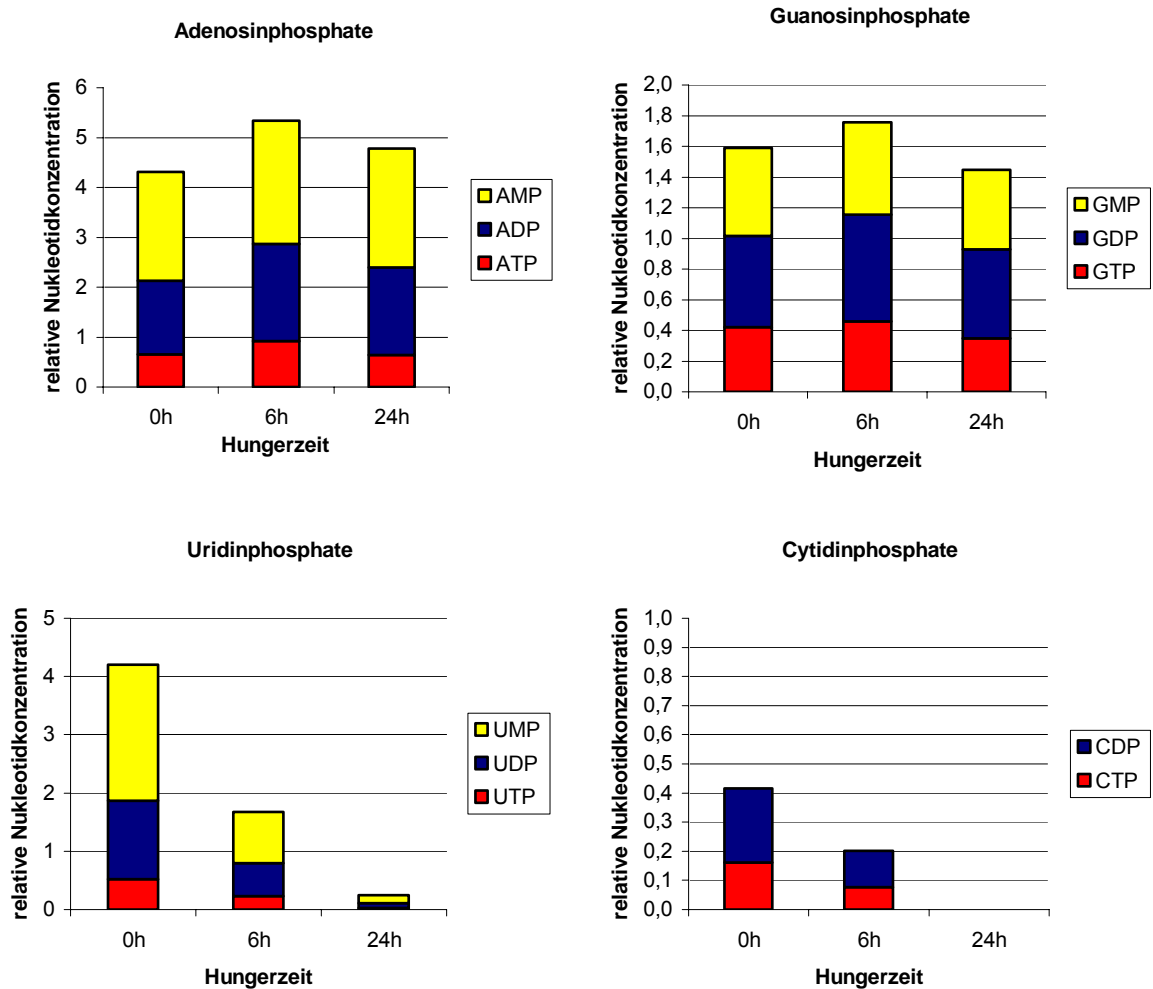


Abb. 3.2: Relative Nukleotidkonzentrationen der ρ^0 -Zellen, denen 0 h, 6 h und 24 h kein Uridin zugeführt wurde. Der Quotient aus der absoluten Nukleotid- und der NAD-Konzentration wurde ermittelt. Die CMP (Cytidylat)-Werte fehlen, weil bei der HPLC-Messung der CMP-Peak mit dem CDPE-Peak überlappte. Auch aufgrund von kontaminierendem Zelldetritus konnten nach 24 h Blockerinkubation die Cytidinphosphate nicht eindeutig bestimmt werden.

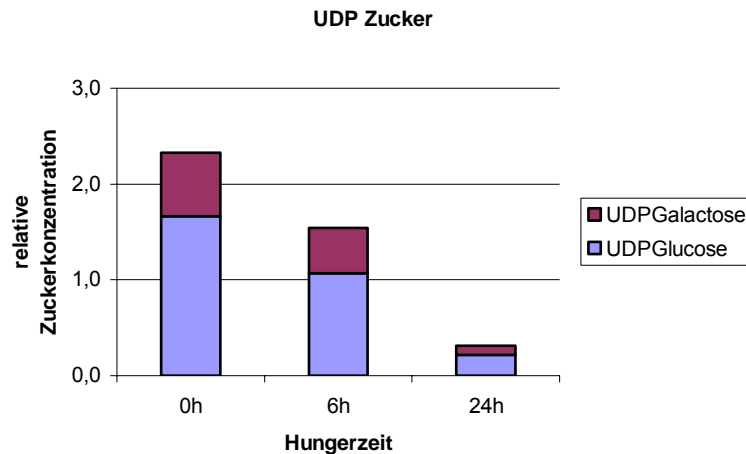


Abb. 3.3: Die Konzentration der Pyrimidin-Zucker zeigte wie die der Pyrimidinnukleotide eine zeitabhängige Abnahme während des Uridinentzugs.

3.2 143B-Zellen unter Antimycin A- und Rotenonbehandlung

Um zu prüfen, ob die Veränderungen, die im Nukleinsäurepool der komplett mtDNA-depletierten Osteosarkomzellen zu sehen waren, auch bei andersartiger Beeinträchtigung der Atmungskette auftreten, behandelten wir Zellen, die mtDNA besitzen, mit den Atmungsketteninhibitoren Antimycin A (A) und Rotenon (Rot). Rotenon greift im Komplex I und Antimycin im Komplex III der Atmungskette an. Für die Experimente wurde die Ursprungszelllinie der ρ^0 -Zellen verwendet, nämlich 143B-Zellen, die eine intakte Atmungskettenfunktion aufweisen. Für 6 h und 24 h wurde Rotenon (100 nM) oder Antimycin A (20 nM) zum Kulturmedium zugeführt und anschließend nach dreimaligem Waschen die Nukleotidextraktion durchgeführt.

3.2.1 143B-Zellen unter Antimycin A-Behandlung

143B-Zellen wurden für 0, 6, bis 24 h mit 20 nM Antimycin A behandelt. Auch der Atmungskettenblock am Komplex III führte wie beim ρ^0 -Zellen-Hungerversuch zu keinem Absinken der Gesamtkonzentration der Purinnukleotide (Mono-, Di- und Triphosphate), aber zu einem Absinken der Pyrimidinnukleotide, sowohl in den Triphosphaten als auch in der Gesamtkonzentration der Phosphatreihen. Vielmehr zeigte sich bei den Purinen mit zunehmender Inhibitionsdauer eine Umverteilung der Triphosphate zu den Monophosphaten. Die relative ATP-Konzentration der 24 h geblockten Zellen fiel im Vergleich zu der relativen ATP-Konzentration der 24 h normal gewachsenen Zellen um 71%, die GTP-Konzentration

um 56%. Weil die Diphosphatmengen, auch die ADP, relativ unverändert blieben und die ATP-Konzentration sank, erhielt man eine geringe Energieladung (ATP/ADP) der Zelle.

Nach 24 h Blockerzufuhr sanken die UTP-Konzentrationen im Vergleich zum Zellansatz ohne Blockerzufuhr über 24 h über 90% ab. Die Synthese der UDP-Zucker erfolgt aus UTP, folglich fiel der UDP-Zucker bei geringen UTP-Mengen. Allgemein fiel der erhöhte UDP-Glucosespiegel in Osteosarkomzellen im Vergleich zu normalen Zellen auf. Abb. 3.4 zeigt ein deutliches Absinken der UTP-Konzentration nach einem Block mit Antimycin A im Komplex III.

Bei beiden Phosphatreihen der Cytidine erfolgte ein Absinken der Konzentrationen innerhalb der 6 h (Abb. 3.4). Da die CMP-Gipfel mit den CDPE-Gipfel im Chromatogramm überlappen, ist das Diagramm der Cytidinphosphate mit Vorsicht zu betrachten, denn eine Miteinbeziehung der ungenau abschätzbaren Cytidinmonophosphate in die Ergebnisse würde zu einer gleich bleibenden Gesamtkonzentration der Cytidine bei fortschreitender Inhibitionsdauer führen (Dr. Simmonds, London, persönliche Mitteilung). Bei den Zellen ohne mtDNA nehmen die Pyrimidinkonzentrationen in allen Phosphaten ab.

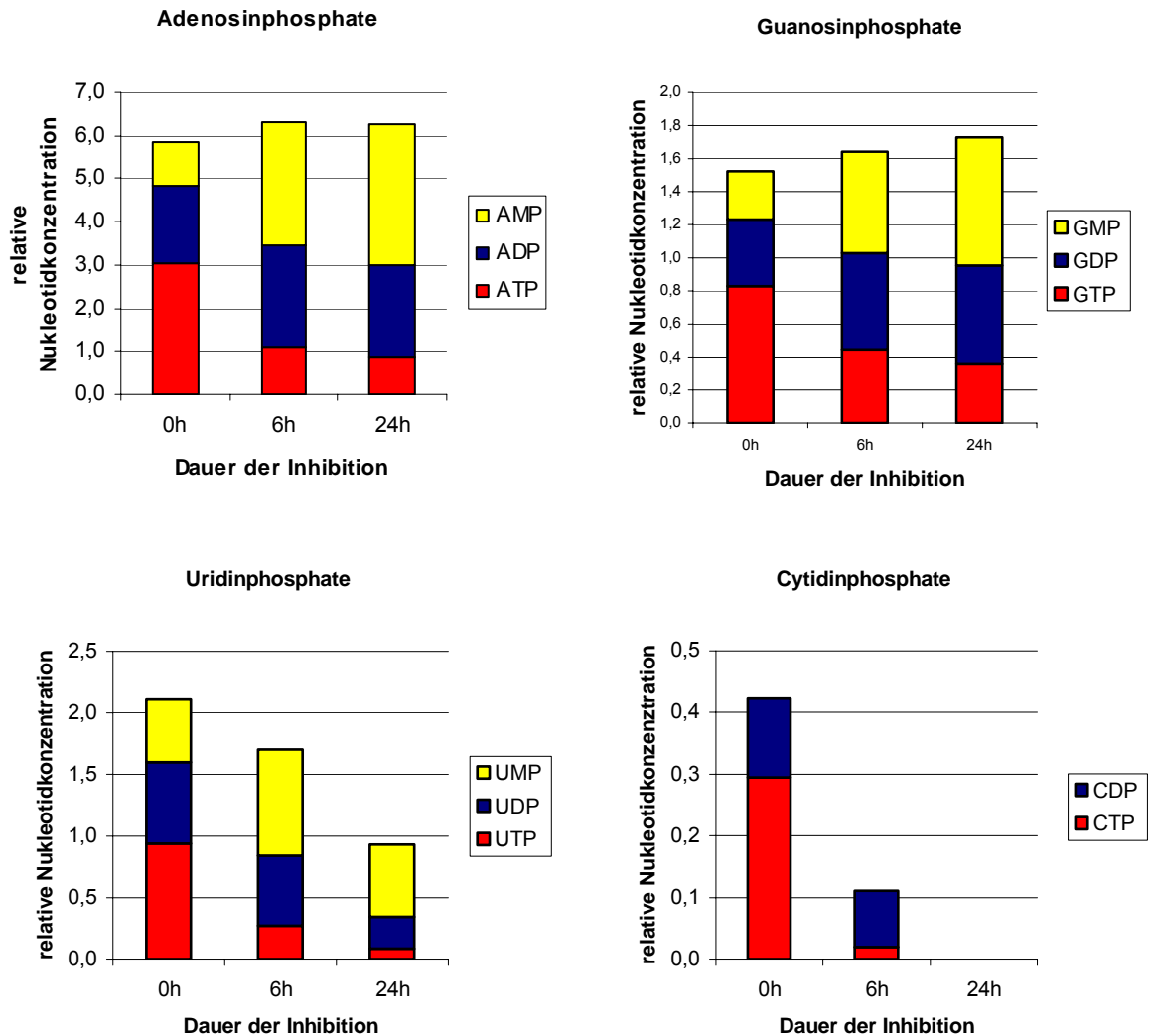


Abb. 3.4: Relative Nukleotidkonzentrationen der 143B-Zellen nach Behandlung mit Antimycin A (20 nM) über 0 h, 6 h und 24 h.

3.2.2 143B-Zellen unter Rotenonbehandlung

143B-Zellen wurden für 0, 6, bis 24 h mit 100 nM Rotenon behandelt (Abb. 3.5). Die Rotenonblockade im Komplex I der Atmungskette ergab keine Senkung der Purinesamtkonzentration, aber einen Abbau der Triphosphate zu Monophosphaten. Den größten Konzentrationsabfall erfuhren ATP und GTP nach 6 h, sowohl bei Rotenon- als auch bei Antimycin A-Einwirkung. Die ATP-Konzentration der über 24 h geblockten Zellen fiel im Vergleich zur ATP-Konzentration der 24 h unbeeinflussten Zellen um 68%, die GTP-Konzentration um 43%. ADP blieb relativ konstant.

Wie beim ρ^0 -Zellen-Hungerversuch und beim A-Block der 143B-Zellen zeigte sich auch diesmal gleichzeitig ein Absinken in den Triphosphaten und in der Gesamtkonzentration der Pyrimidine. Die Cytidine fielen unter Antimycin A stärker als unter Rotenon ab. Der Effekt des Antimycins auf die CTP- und CDP-Konzentrationen war stärker als der des Rotenons. Auch die Effekte auf ATP und GTP waren ähnlich. Die UTP-Gesamtmenge nahm nach 6 h Block um 15% und nach 24 h Block um 70% ab. Sowohl nach Inkubation mit A als auch nach Inkubation mit Rot fiel der UDP-Zucker-Spiegel (UDPGalactose + UDPGlucose) ebenfalls ab (Abb. 3.6).

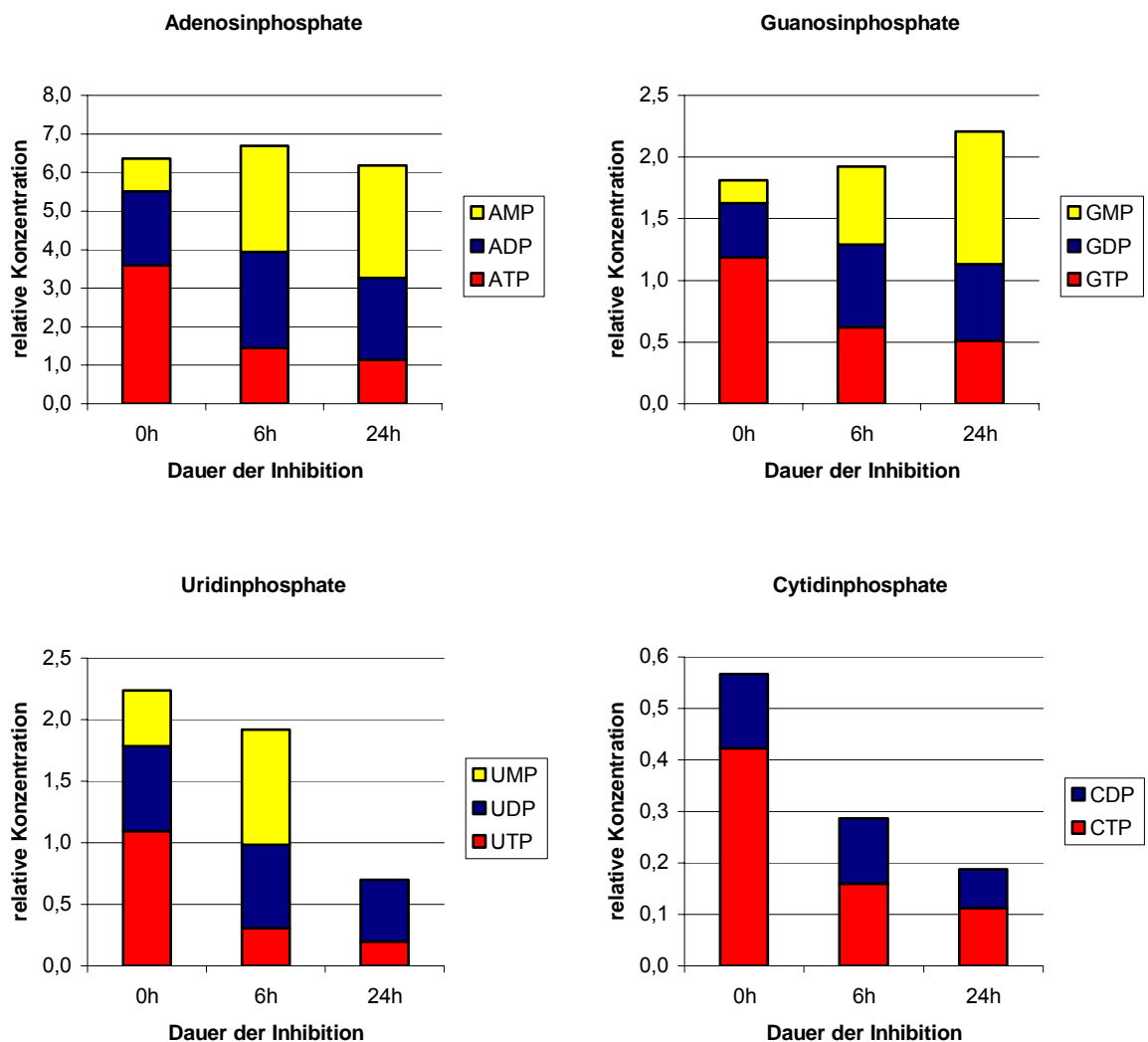


Abb. 3.5: Nukleotidkonzentrationen der 143B-Zellen nach 0 h, 6 h und 24 h Inkubation mit Rotenon (100 nM).

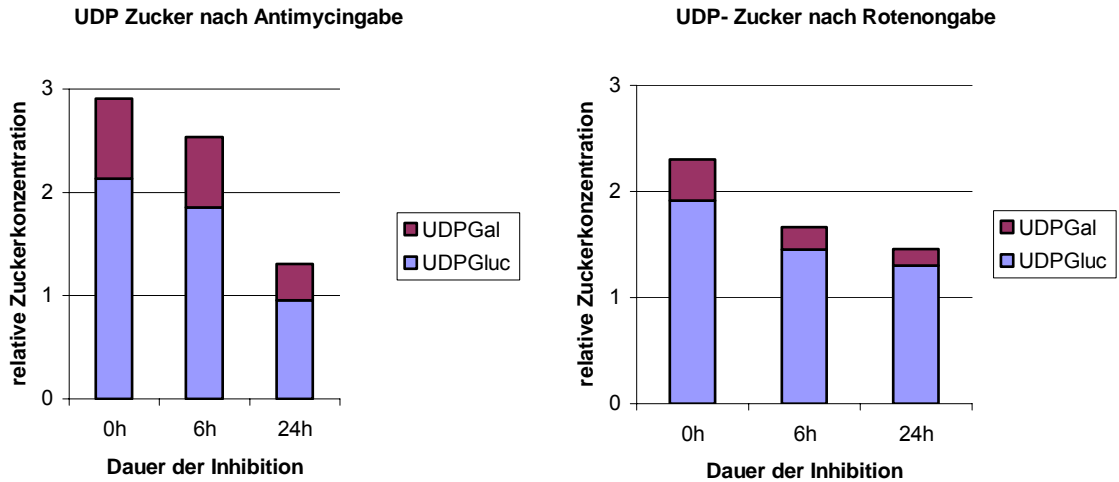


Abb. 3.6: Die UDP-Zucker (UDPGalactose + UDPGlucose), deren Synthese UTP abhängig ist, verminderten sich ebenfalls, besser zu erkennen im Antimycinversuch, bei dem ein Rückgang um 55% zu erkennen war.

3.3 Keratinozyten unter Antimycin A- und Rotenonbehandlung

Wir arbeiteten nicht nur mit malignen Osteosarkomzellen, sondern auch mit gesunden menschlichen Zellen, nämlich Keratinozyten. Der Versuchsplan sah vor, die Hautzellen eine Woche lang mit Atmungsketteninhibitoren zu behandeln. Die Zellen überlebten allerdings beim ersten Experiment nur etwa 24 h, woraufhin die Blockerinkubationszeit von einer Woche auf 24 h gesenkt wurde. In der Wachstumsphase wurden die Zellen über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Antimycin A oder Rotenon behandelt. Anschließend wurden sie durch Trypsinisierung von der Schale gelöst, geerntet und in mehreren Waschschritten für die Nukleotidextraktion vorbereitet.

Ab einer Konzentration von 10 nM waren sowohl bei Antimycin A als auch bei Rotenon ungünstige Effekte auf das Keratinozytenwachstum zu erkennen. Wie die HPLC-Nukleotidanalysen später zeigten, kam es zu einer starken Abnahme der Gesamtkonzentration der Pyrimidinnukleotide, während hauptsächlich die Purinnukleotide durch eine Senkung der Triphosphate zu den Monophosphaten auffielen (Abb. 3.7). Die CTP- und CDP-Konzentrationen sanken unter Rotenon stärker als unter Antimycin A ab. Ebenso fiel auf, dass die CTP-Werte ab 50 nM Rotenon gegen 0 gingen, während gleiche Effekte bei Antimycin A erst ab der höchsten verwendeten Konzentration 20 nM auftraten. Dieses Ergebnis war mit dem der UTP vergleichbar, in den drei höchsten

Rotenonkonzentrationen waren die UTP-Werte am niedrigsten, während nur die zwei höchsten A-Konzentrationen zu einer starken Absenkung der Nukleotidmengen führten. Zusammenfassend zeigte sich, dass Antimycin A und Rotenon mehr oder weniger den gleichen Effekt auf die Pyrimidinnukleotidsynthese hatten. Die UDP-Zucker (UDPGal + UDPGluc) sanken mit steigender Antimycin A- und Rotenon-Konzentration (Abb. 3.8).

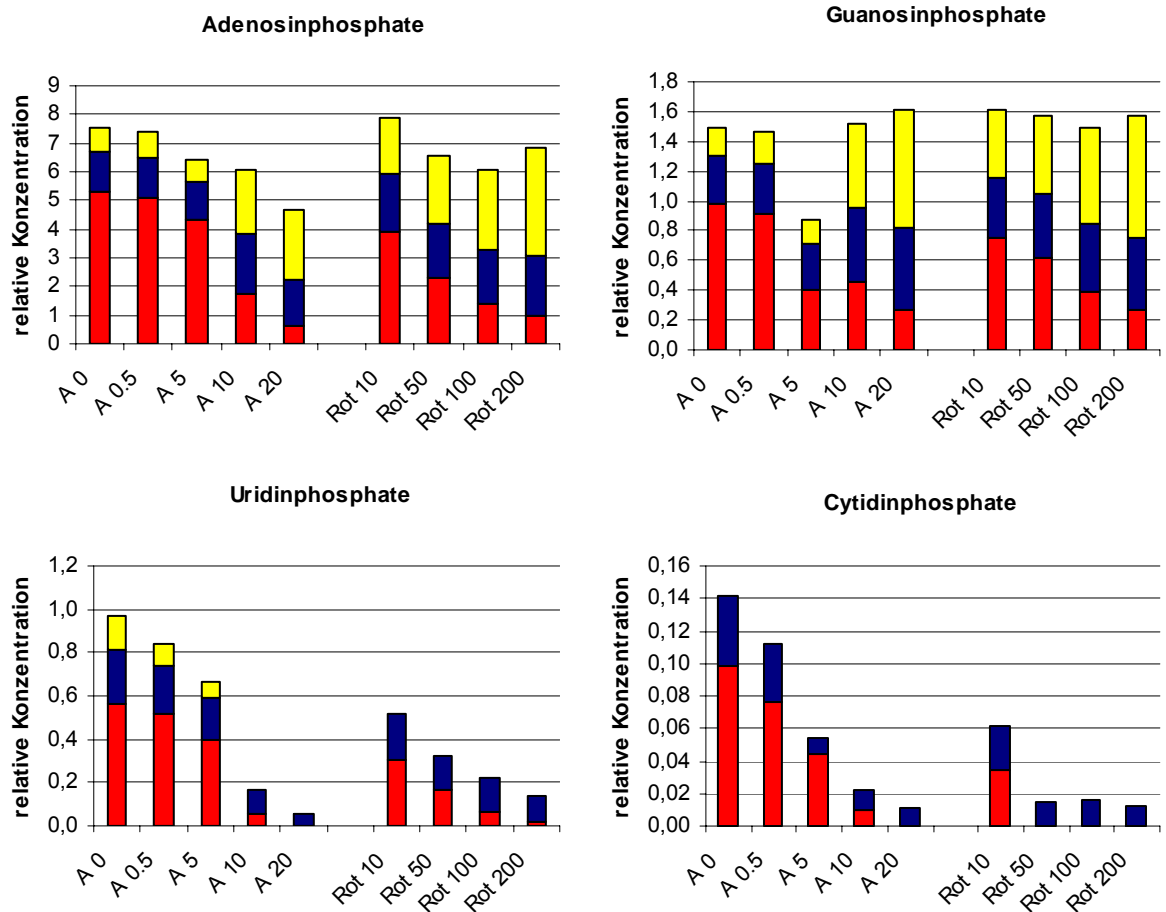


Abb. 3.7: Relative Nukleotidkonzentrationen (absolute Konz / [NAD]) in Keratinozyten, die mit steigender Konzentration Antimycin A oder Rotenon für 24h behandelt wurden.

(Angaben jeweils in nM) NMP = ■ ; NDP = ■ ; NTP = ■

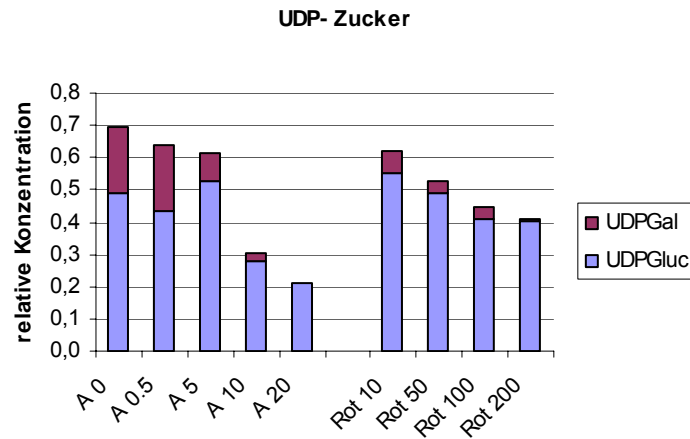


Abb. 3.8: Die Konzentrationen der UDP-Zucker (UDPGal + UDPGluc) sanken mit zunehmender Intensität der Antimycin A- und Rotenonbehandlung ab. Die relativen UDP-Glucose-Konzentrationen betragen in Keratinozyten nur 25% der Konzentrationen in Osteosarkomzellen.

Um unspezifische Effekte einer Rotenonüberdosierung auf die 143B-Zellen auszuschließen, wurde die Rotenonkonzentration um 50% gesenkt; die Auswirkungen auf die Pyrimidinnukleotide waren jedoch unverändert (Abb. 3.9). Die Applikation von Rotenon in Konzentrationen, die über 100 nM hinausgehen, verursachte keine weitere Zunahme der Atmungskettenblockade (persönliche Mitteilung, Dr. Hofhaus, Biochemisches Institut der HHU). Da unter diesen Umständen weiter ein Elektronfluss in der Atmungskette zu registrieren ist, muss dieser durch Zufluss über den Komplex II zustande kommen. Die unvollständige Atmungskettenblockade durch Rotenon lässt vermuten, dass dessen Wirkung auf den Komplex I den Zelltod bzw. das stark beeinträchtigte Zellwachstum nicht alleine erklären kann.

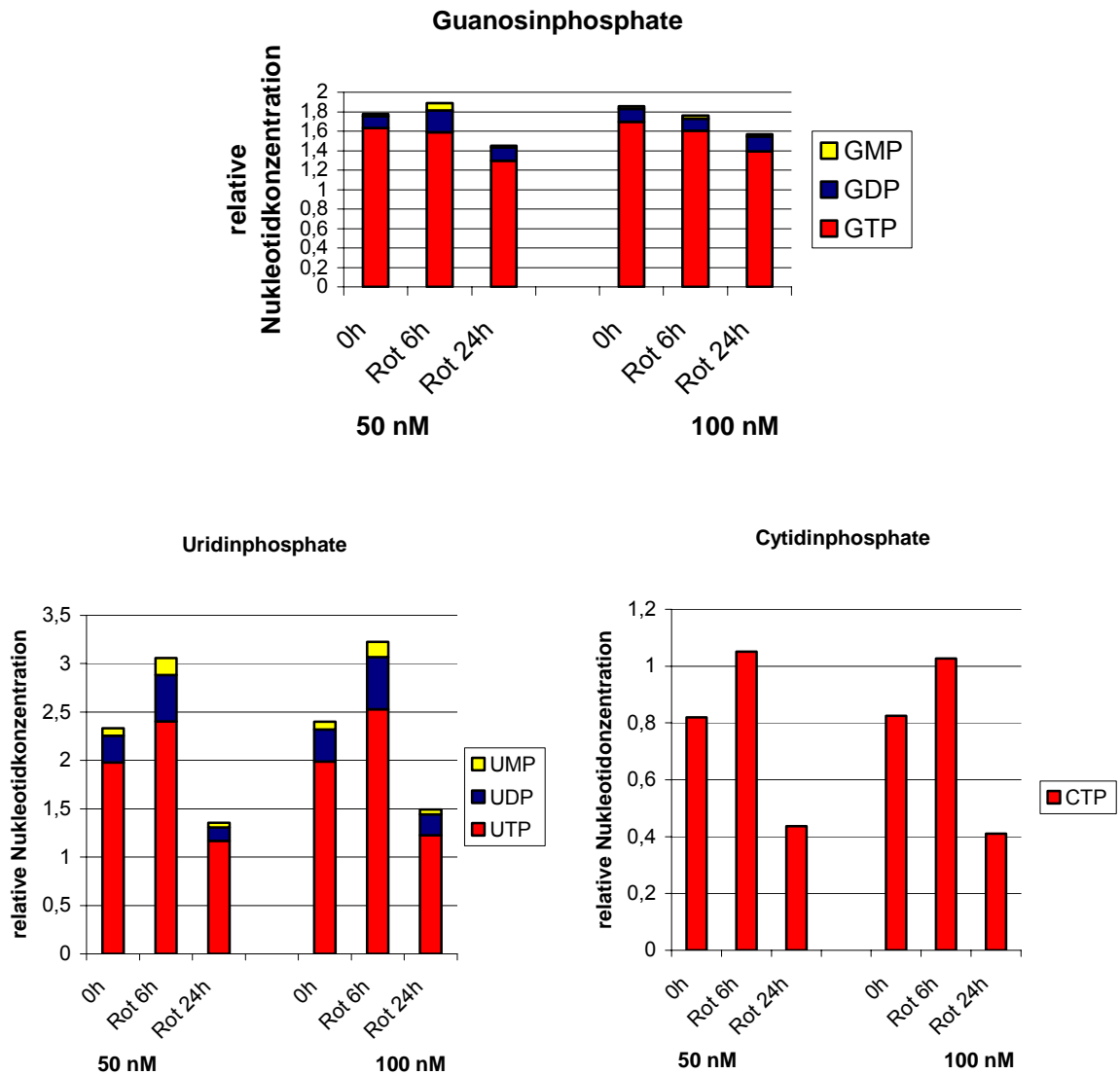


Abb. 3.9: Der Atmungskettenblock in 143B-Zellen im Vergleich zwischen geringerer (50 nM) und höherer (100 nM) Rotenonkonzentration (Rot), um unspezifische Effekte durch erhöhte Rotenondosis auszuschließen. Die Kontrollen sind 143B-Zellen ohne Blockerinkubation. Die relativen Konzentrationen wurden aus dem Quotienten aus Nukleotidkonzentration und NAD bestimmt.

3.4 ρ^0 -Transformanten mit unterschiedlich ausgeprägten Komplex-I-Defekten

Um einen unspezifischen Effekt des Rotenons beim vorhergehenden Experiment auszuschließen, wurden zum Vergleich Zellen mit einem definierten Komplex-I-Defekt analysiert, dem eine mtDNA Mutation zugrunde liegt (Hofhaus *et al.*, 1995) (Tab. 3.1.). Durch Kultivierung von ρ^0 -Zellen mit fremden Mitochondrien waren transmitochondriale Zelllinien mit dieser Mutation hergestellt worden. Die bereits erwähnten Ursprungszellen der ρ^0 -Zellen (143B-Zellen) fungierten als Kontrolle. Die Komplex-I-Mutanten boten die Möglichkeit, den Einfluss eines spezifischen Komplex-I-Atmungskettendefektes auf die de-novo-Pyrimidinbiosynthese zu untersuchen.

Zellen	Eigenschaften
143B	Kontrolle, normale Atmungskettenfunktion
C4T	100% Ausfall der Komplex-I-Aktivität durch eine C-Insertion und Rastermutation im ND4-Gen
LH5	50% Ausfall der Komplex-I-Aktivität, Punktmutation der mtDNA 11778 G \rightarrow A
LH53	Normale Komplex-I-Aktivität, mit Wildtyp-mtDNA, Mitochondrien vom selben Patienten gewonnen wie bei LH5-Zellen, Kontrolle zu LH5-Zellen

Tab. 3.1: Charakteristika der Zellen, die für Experimente zum Einfluss von Komplex I-Defekten verwendet wurden.

C4T- und LH5-Zellen sind transmitochondriale Zelllinien, die durch mtDNA-Mutationen charakterisiert sind. Diese Mutationen führen zu einer Aktivitätsabsenkung des Komplex I der Atmungskette. C4T-Zellen sind ρ^0 -Zellen, die transferierte Mitochondrien besitzen. Diese Mitochondrien stammten aus rotenonresistenten menschlichen Zellen (humanen VA₂B Mutanten), die sich durch eine lange Behandlung mit Rotenon in verschiedenen Ansätzen durch eine Baseninsertion von Cytosin in Position 10947 mit Rastermutation an der mtDNA etabliert hatten. Das betroffene Gen kodiert für die Untereinheit ND4 des Komplex I, der

infolge der Rastermutation einen kompletten Ausfall der Aktivität aufwies (Hofhaus and Attardi, 1993).

Bei den LH5-Zellen handelte es sich um ρ^0 -Zellen, die transferierte Mitochondrien aus kultivierten Hautfibroblasten von Patienten mit einer Leber'schen hereditären Optikusneuropathie (LHON) trugen. Diese Mitochondrien enthalten eine mtDNA, in der eine Punktmutation an der Stelle 11778 zum Austausch der Base Guanin gegen Adenin und zum Einbau des Histidins anstatt des Arginins in die Aminosäurekette bei der Translation führt. Diese Stelle befindet sich in dem Gen, das für eine Untereinheit des Komplex I kodiert. Der Purinaustausch führte bei LH5-Zellen zu einer Absenkung der NADH-Dehydrogenase Aktivität um 50%. (Hofhaus *et al.*, 1996).

LH53-Zellen stammen aus dem gleichen Transformationsexperiment, weisen allerdings Wildtyp-mtDNA und eine normale Komplex-I-Aktivität auf. Die Mitochondrien wurden von demselben Patienten mit LHON gewonnen wie bei der Etablierung der LH5-Zellen.

3.4.1 C4T-Zellen unter Antimycin A- und Rotenonbehandlung

Die C4T-Zellen wurden über 24 h mit Antimycin A (50 nM) und Rotenon (100 nM) inkubiert und mit einem unbehandelten Kontrollansatz von C4T-Zellen verglichen, um zu sehen, ob eine Rotenonblockade ähnliche Wirkungen auf die Pyrimidinkonzentrationen hat wie eine spezifische mtDNA-Mutation mit bekannter Wirkung auf die Komplex-I-Aktivität.

Bei den Uridin- und Adenosinphosphaten fiel auf, dass die Nukleotide zum großen Teil als Monophosphate vorlagen. Deren Anteil blieb nach Atmungskettenblockade bei den Purinnukleotiden nahezu unverändert. Die unveränderten Gesamtkonzentrationen der Purine waren schon beim Hungerversuch der ρ^0 -Zellen aufgefallen. Im Gegensatz zu Antimycin A kam es unter Rotenoninkubation zu einem Rückgang des UMP- und des CDP-Spiegels (Abb. 3.10). Weder unter Antimycin A noch unter Rotenon sah man eine weitere Umverteilung von den Triphosphaten zu Monophosphaten, wie es bei den 143B-Zellen mit intaktem Komplex I der Fall gewesen war (Abb. 3.4, 3.5) Die relativen Zuckerkonzentrationen betragen wie bei den Keratinozyten etwa 25% der UDP-Zuckerkonzentrationen der 143B-Zellen (Abb. 3.10).

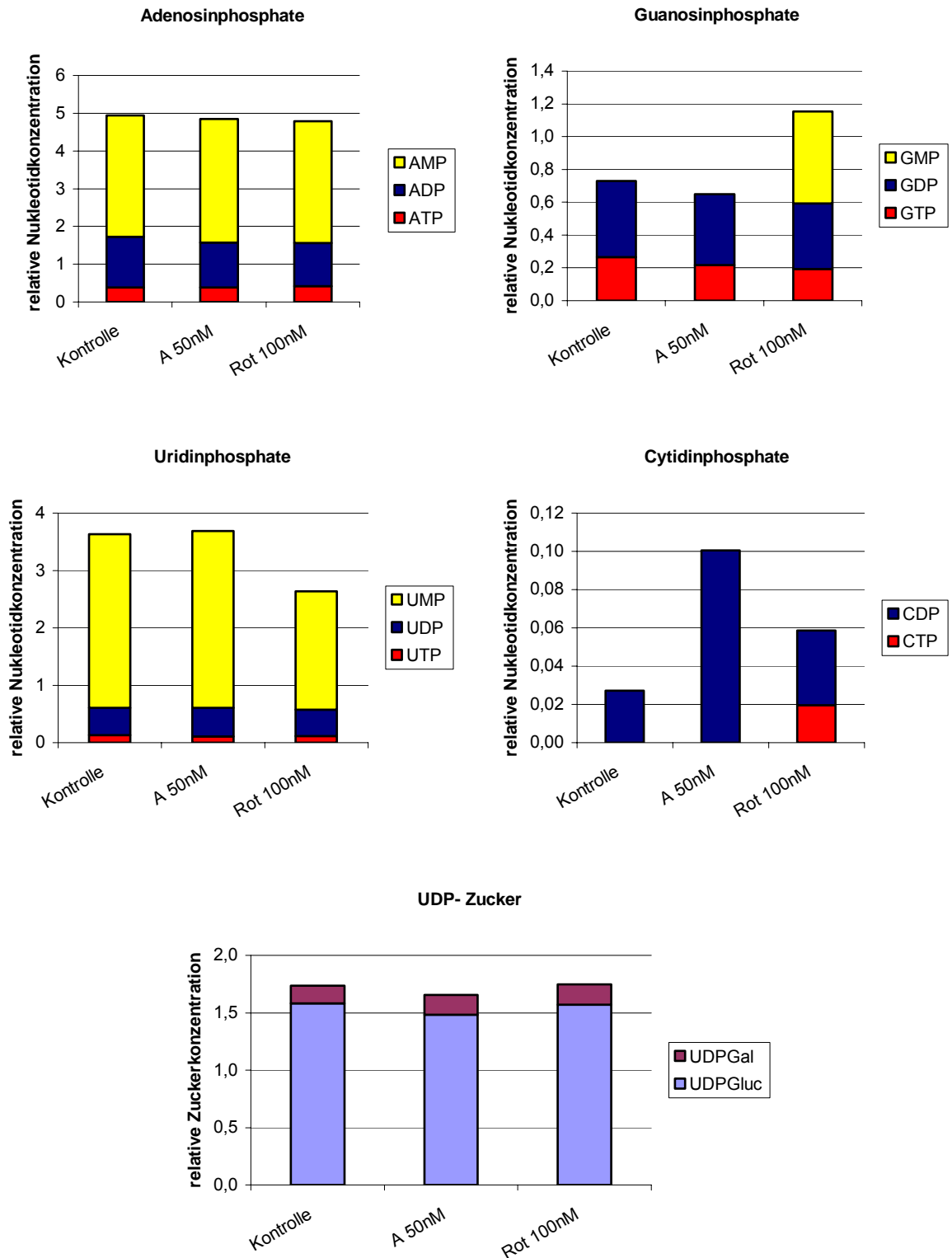


Abb. 3.10: Nukleotidkonzentrationen in C4T-Zellen mit komplettem Komplex-I-Ausfall durch C-Insertion und Rastermutation im ND4-Gen. Die Zellen wurden ohne und mit Blockern A = Antimycin A und Rot = Rotenon 24h behandelt. Guanosinphosphate konnten methodisch nicht ermittelt werden. Die Konzentration der UDP-Zucker blieb in allen drei Ansätzen nahezu unverändert.

3.4.2 Gegenüberstellung der ρ^0 -Transformanten

Die Zellen mit genetisch bedingter Verminderung der Komplex-I-Aktivität ließen - im Gegensatz zur Rotenonbehandlung - keine drastischen Effekte auf die Pyrimidinbiosynthese erkennen (Abb. 3.11). Unter Rotenon nahm die Gesamtkonzentration der Pyrimidinnukleotide ähnlich stark ab wie bei Antimycin A-Behandlung von 143B-Zellen und Keratinozyten.

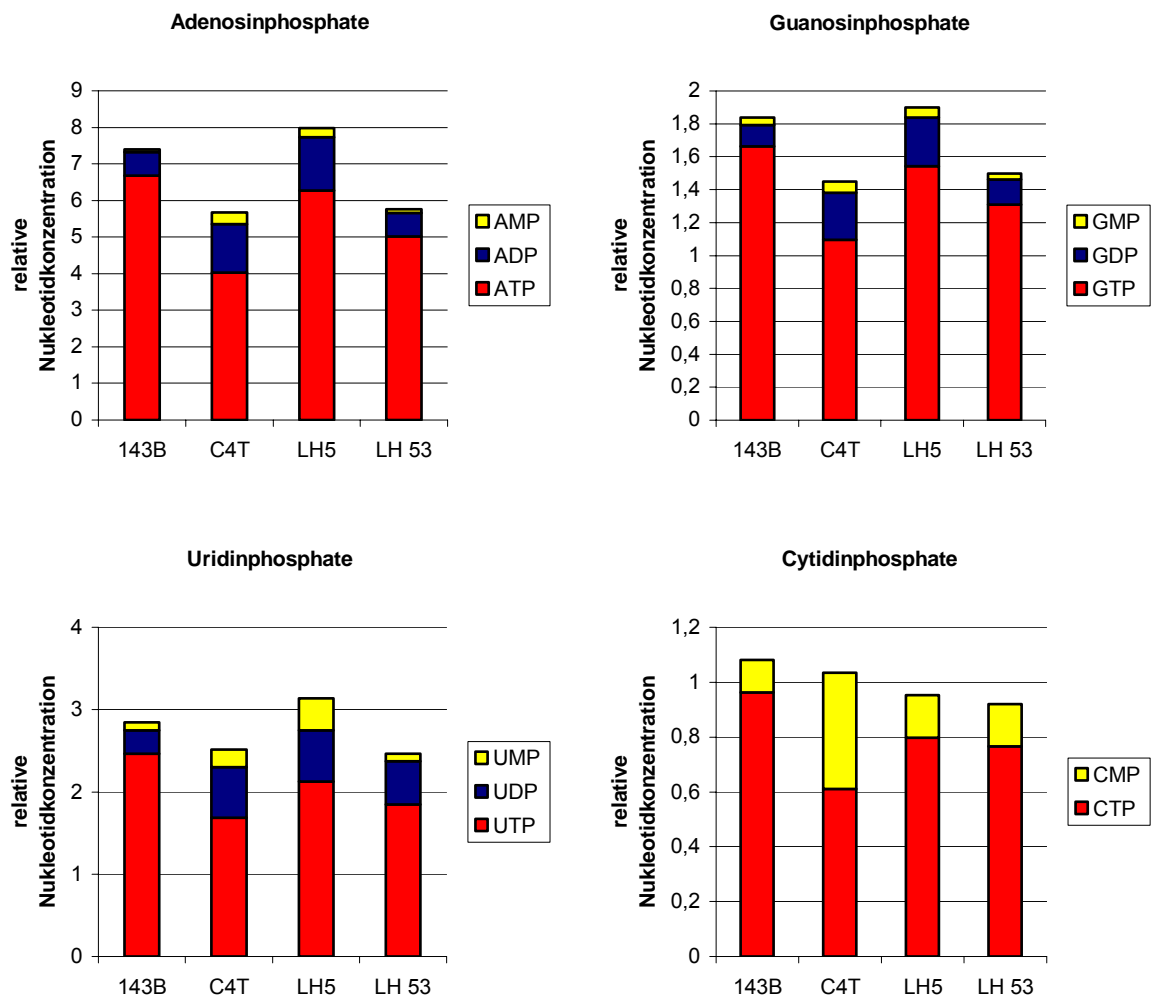


Abb. 3.11: Nucleotidkonzentrationen in ρ^0 -Transformanten mit Komplex-I-Defekt von unterschiedlichem Ausmaß

143B: Diese Zellen fungierten als Kontrolle

C4T: Diese Zellen wiesen eine Komplex-I-Aktivität von 0% auf.

LH5: Diese Zellen wiesen eine Komplex-I-Aktivität von 50% auf

LH53: Diese Zellen waren mit Wildtyp-mtDNA transformiert und fungierten als Kontrolle für die LH5-Zellen

3.5 Mono-Mac-1-Zellen

Zur Abklärung, ob Funktionsstörungen in der mitochondrialen Atmungskette in Knochenmarkzellen auch zu Veränderungen der zellulären Nukleotidkonzentrationen führten, wurden auf ähnliche Weise wie bei vorhergehenden Experimenten auch Atmungskettenblockaden in Mono-Mac-1-Zellen induziert.

Eine Mono-Mac-Mutterzelllinie war aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie im Rezidiv gewonnen worden, aus der die monozytische Leukämiezelllinie Mono-Mac-1 isoliert wurde. Nach der FAB-Klassifikation handelte es sich dabei um den Subtypen M5 mit monozytär, monoblastisch imponierender Morphologie.

Die angesetzten Zellkulturen wurden alle sieben Tage kontrolliert. Es dauerte eine gewisse Zeit, bis die Zellen nach der langen Lagerung bei Temperaturen um -30°C und der Beanspruchung durch den Wärmeschock und die Zentrifugationen ihre Zellproliferation wieder aufnahmen. Bei den regelmäßigen Kontrollen wurden die Kulturgefäße sorgfältig bezüglich Verkeimung beobachtet.

3.5.1 Atmungskettenblockade in Mono-Mac-1-Zellen unter Verwendung von nicht-dialysiertem Serum

Die in Kultur proliferierenden Mono-Mac-1-Zellen wurden für 24 h mit Antimycin A oder Rotenon behandelt. Da die Atmungsketteninhibitoren in Ethanol gelöst waren, enthielt der Ansatz mit 0 nM Antimycin A ebenfalls Ethanol. Nachdem sich zeigte, dass die Nukleotidkonzentrationen sich nach einem Tag Atmungskettenblockade nicht veränderten und auch die Zellzahl zu keinem auffälligen Absinken führte, wie das bei den Osteosarkomzellen und Keratinozyten der Fall gewesen war, wurden erneut mehrere Zellansätze hergestellt und 96 h mit verschiedenen Blockerkonzentrationen inkubiert, um nun durch die längere Behandlung deutlichere Effekte des Blockes auf das Zellwachstum zu sehen (Abb. 3.12).

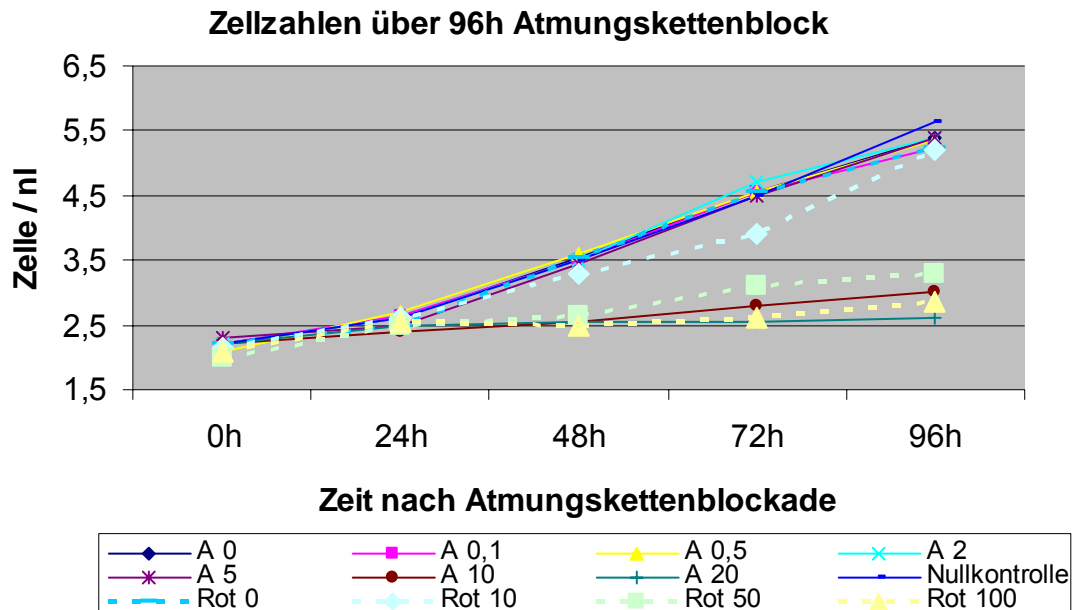


Abb. 3.12: Wachstumskurve der Mono-Mac-1-Zellen, die über 96h mit verschiedenen Konzentrationen / nM an Antimycin A (A) oder Rotenon (Rot) inkubiert wurden.

Ab 24 h nach Atmungskettenblock zeigten sich dosisabhängige Unterschiede in der Zellvermehrung. Nur Zellzahlen der Kulturen für 0 nM bis 5 nM Antimycin A und der Nullkontrolle ohne Ethanolzusatz stiegen steil an. Die übrigen Zellen, die mit höheren Inhibitorkonzentrationen inkubiert worden waren, zeigten vielmehr eine Stagnation der Zellvermehrung (Abb. 3.12). Gleichzeitig fiel bei diesen Zellkulturen eine Gelbverfärbung des Nährmediums (Farbindikator) nach 48 h Atmungskettenblockade auf. Da der Farbindikator sich in sauren Medien gelb färbt, wurden die Zellen auf ihre Glucosekonzentration und den pH-Wert hin untersucht (Abb. 3.13). Bei allen vier höchsten Blockerkonzentrationen waren die pH- und Glucosewerte erniedrigt.

Bei Antimycin A und Rotenon sah man in den höchsten Konzentrationen eine vergleichbare hemmende Wirkung auf die Zellproliferation. Die unter hohen Inhibitorkonzentrationen inkubierten Zellen sahen unter dem Mikroskop diffus aus, mit inhomogenen granulierten Zellgrenzen, wohingegen die Nullkontrolle mikroskopisch durch glatte klare Zellgrenzen auffiel. Bei der Trypanblaufärbung färbten sich wenige Zellen der stark geblockten Kulturen blau.

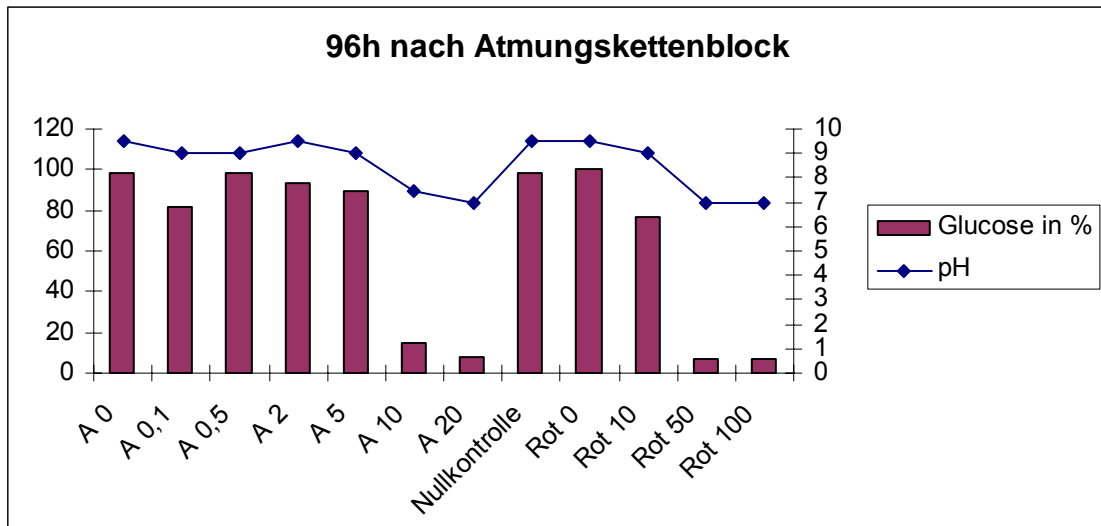


Abb. 3.13: Glucosekonzentration und pH-Wert der Mono-Mac-Zellsuspension nach 96-stündiger Inkubation mit Atmungsketteninhibitoren

Nachdem diesmal ein hemmender Effekt der Inhibitoren auf das Wachstum der Zellen gezeigt worden war, wurde auch nach 113-stündiger Atmungskettenblockade eine Nukleotidextraktion durchgeführt. Um den antiproliferativen Effekt eines über die Dauer entstehenden Glukosemangels zu verhindern, wurde in Abständen von 48 h das Nährmedium erneuert. Damit eine Übersäuerung der Kultur nicht zu einer Proliferationsbeschränkung führte, wurden die Zellen abzentrifugiert und so das entstandene Laktat entfernt. Bei den stark inhibierten Zellen trat nämlich wegen eines pH-Abfalls in der Kultur eine Gelbverfärbung des Nährmediums auf. Auch Rotenon und Antimycin A wurden erneuert, um deren Konzentrationen trotz des zellulären Turnovers konstant zu halten. Auch diesmal fand sich kein Absinken der Nukleotidkonzentrationen. Die Adenosinphosphate und Cytidinphosphate waren bei allen Inhibitorkonzentrationen ähnlich, es war weder ein Absinken der Gesamtkonzentration noch eine Umverteilung von Tri- zu Monophosphaten festzustellen (Abb. 3.14). Dennoch kam es zu einer Stagnation der Proliferation der stärker geblockten Zellen im Vergleich zu den Nullkontrollen, deren Zellzahlen sich nach 113 h nahezu verdoppelten (Abb. 3.15). Das unerwartete Ergebnis bei den Nukleotidkonzentrationen wurde auf das im Nährmedium enthaltene nicht-dialysierte fetale Kälberserum zurückgeführt, das Nukleoside, Uridin und Hypoxanthin enthält, also Vorstufen, die von den Zellen über die Wiederverwertungsreaktion zur Nukleotidregeneration genutzt werden können.

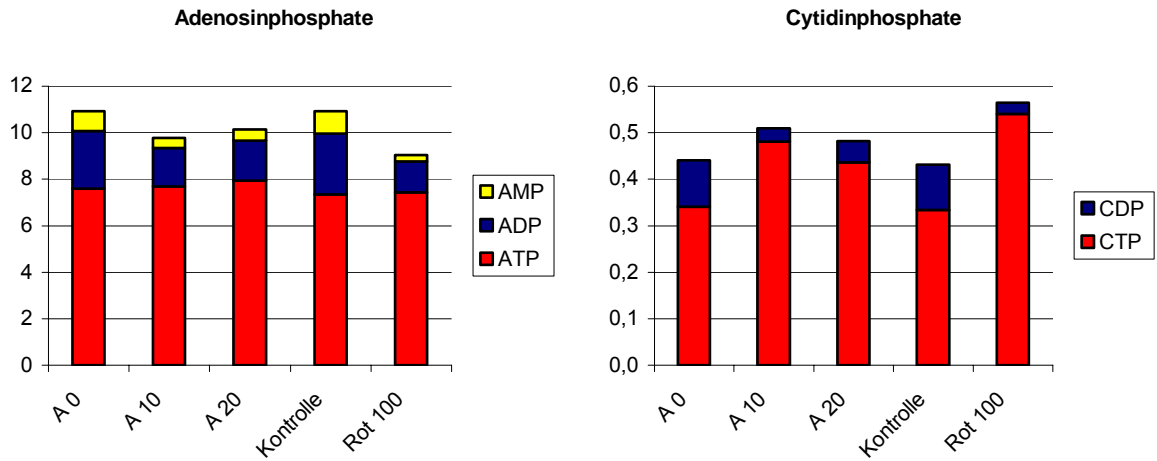


Abb. 3.14: Relative Nukleotidkonzentrationen der mit Inhibitoren Antimycin A (A) und Rotenon (Rot) behandelten Mono-Mac-1-Zellen. (Konzentration / [NAD])

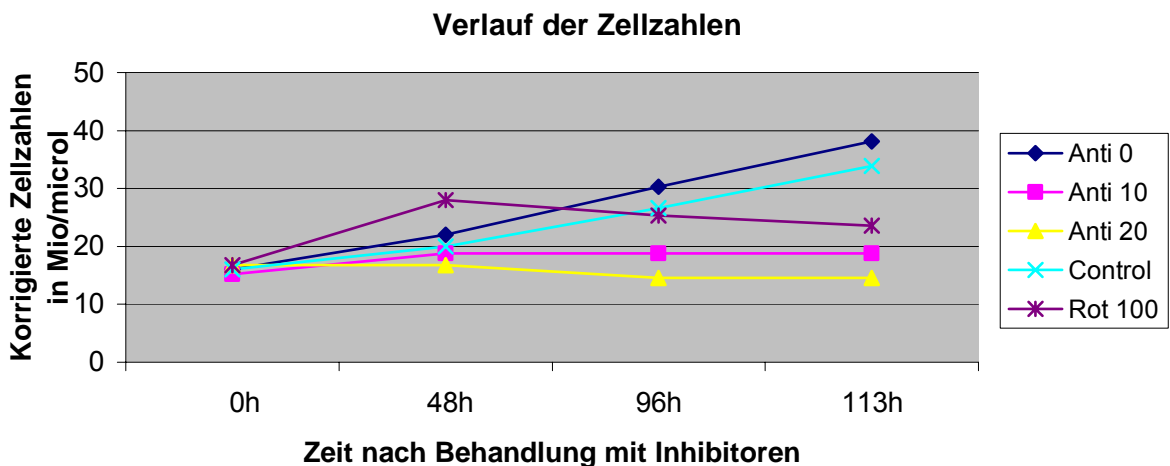


Abb. 3.15: Korrigierte Wachstumskurve nach 113h Inhibitorenbehandlung bei Mono-Mac-1-Zellen mit Berücksichtigung des Zellverlustes durch den Medienwechsel.

Es zeigte sich eine Proliferationshemmung der Zellen, die alle 48 h in Antimycin A und Rotenon inkubiert wurden. Bei der Inhibitorenzugabe wurde den Zellen auch frisches Nährmedium zugegeben, das 10% FCS enthielt. Der Zellverlust und Zellanstieg nach dem Mediumwechsel war auf die Bearbeitung der Zellen während des Mediumwechsels zurückzuführen. Um diesen Fehler in der Zellzahlmessung auszugleichen, wurde eine Korrektur des Graphen vorgenommen. Dabei fiel der Anstieg der Kontrollzellzahlen bei

stagnierendem Wachstum der mit Blockern behandelten Zellen auf (Abb. 3.15). Bevor der Mediumwechsel erfolgte, wurden die Glucosekonzentrationen der Zellkulturen gemessen, es ließ sich in allen Ansätzen Glucose nachweisen, so dass der Glucosemangel keinen Grund für die beeinträchtigte Wachstumsrate darstellte (Abb. 3.16).

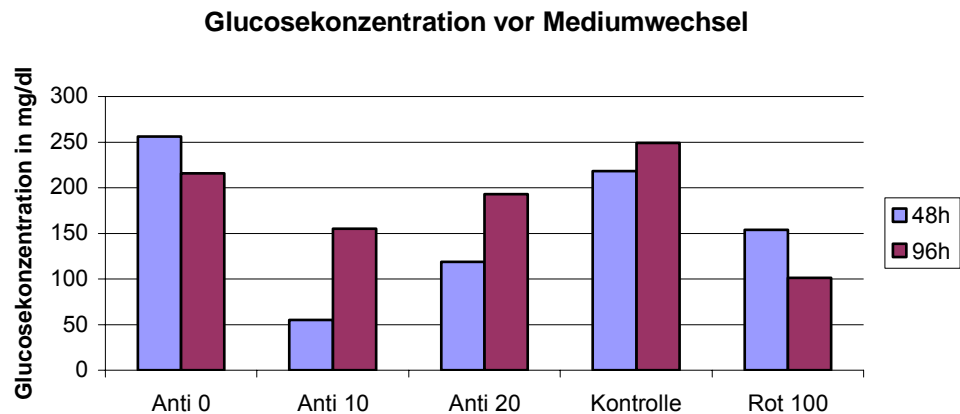


Abb. 3.16: Glucosekonzentration in der Zellkultur

3.5.2 Atmungskettenblockade in Mono-Mac-1-Zellen unter Verwendung von dialysiertem Serum

Diesmal wurden die Zellen in dialysiertem Nährmedium inkubiert, um die Bereitstellung von Nukleotiden über die Wiederverwertungsreaktion zu vermeiden.

Die erste Nukleotidextraktion wurde nach 2 Tagen (Tab. 3.3), die zweite nach 4 Tagen (Tab. 3.4) Blockerinkubation durchgeführt. Während der gesamten Zeit wurde nur Nährmedium verwendet, das dialysiertes Serum enthielt. Kurz vor der Extraktion führten wir diesmal auch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Lymphoprep durch, um überwiegend vitale Zellen zu gewinnen, deren Größenverteilung im Leukozytenhistogramm des Coulter Counters kontrolliert wurde.

Probenummer	Initialien
Nr. 1 ohne Ethanol	Nullkontrolle
Nr. 2 mit Ethanol	0 nM Antimycin A
Nr. 3	5 nM Antimycin A
Nr. 4	10 nM Antimycin A
Nr. 5	20 nM Antimycin A
Nr. 6	40 nM Antimycin A
Nr. 7 mit Ethanol	0 nM Rotenon
Nr. 8	10 nM Rotenon
Nr. 9	50 nM Rotenon
Nr.10	100 nM Rotenon
Nr.11	200 nM Rotenon

Probe	Initialien
Nr. 401 ohne Ethanol	Nullkontrolle
Nr. 402 mit Ethanol	0 nM Antimycin A
Nr. 403	5 nM Antimycin A
Nr. 404	10 nM Antimycin A
Nr. 405	20 nM Antimycin A
Nr. 406	40 nM Antimycin A
Nr. 407 mit Ethanol	0 nM Rotenon
Nr. 408	10 nM Rotenon
Nr. 409	50 nM Rotenon
Nr. 410	100 nM Rotenon
Nr. 411	200 nM Rotenon

Tab. 3.3: 1.dNTP Extraktion vom 29.11.03
Zellen mit dialysiertem Nährmedium kultiviert.

Tab. 3.4: 2.dNTP Extraktion vom 01.12.2003

Nach eintägiger Atmungsketteninhibition zeigten die Zellzahlen keine Veränderungen im Vergleich zum Vortag. Allerdings ließ sich mittels Leukozyten-Histogramm feststellen, dass sich bei höherer Blockerkonzentration die Größenverteilung zugunsten kleinerer Zellen verschob.

Bei den Nullkontrollen reichten die Zellvolumina am 2.Tag nach Blockergabe bis zu 450 fl. Bei Atmungskettenblockade nahm das Zellvolumen dosisabhängig bis unter 350 fl ab. Gleichzeitig fiel bei den Kulturen mit Rotenon 200 nM und Antimycin A 40 nM eine gelbliche Farbänderungen des Indikators des RPMI-Mediums auf, die eine Absenkung des pH anzeigte. Die dosisabhängige Gelbverfärbung des Nährmediums zeigt indirekt die Wirkung der Atmungskettenblockade an, da es über kompensatorisch gesteigerte Glykolyse mit Laktatbildung zur Ansäuerung des Mediums kommt.

Die Zellzahlen der mit höheren Blockerkonzentrationen behandelten Zellen nahmen über vier Tage dosisabhängig leicht ab (Abb. 3.17). Gleichzeitig zeigte das Leukozytenhistogramm eine Zunahme des Zelldetritus. Bei den Nullkontrollen stiegen die Zellzahlen hingegen um das 1,5 bis 2-fache an. Die mikroskopisch homogenen, glatt begrenzten, runden Zellen korrelierten im Leukozytenhistogramm mit einem Gipfel um 200 fl. Das Auftreten eines mikroskopisch unruhigen Bildes, bei dem inhomogene, dysmorphe, absterbende Zellen verschiedener Größe imponierten, korrelierte mit einem breiten Peak von 0 bis etwa 150 fl. Der Teil des Histogramms, der zwischen 0 und 50 fl liegt und Detritus anzeigt, wurde, angeregt durch das mikroskopische Bild, im Laborjargon „Müll-Peak“ genannt.

Bei der Bearbeitung dieser Zellen fiel auf, dass sich das Sediment der stärker blockierten Zellen schnell und leicht wie Pulver suspendieren ließ, wohingegen die Kontrolle beispielsweise nach Zentrifugation als festes zusammenhängendes Pellet wirkte. Ein Grund dafür könnte die fehlende Expressierung der Adhäsionsmoleküle auf Oberflächen sein.

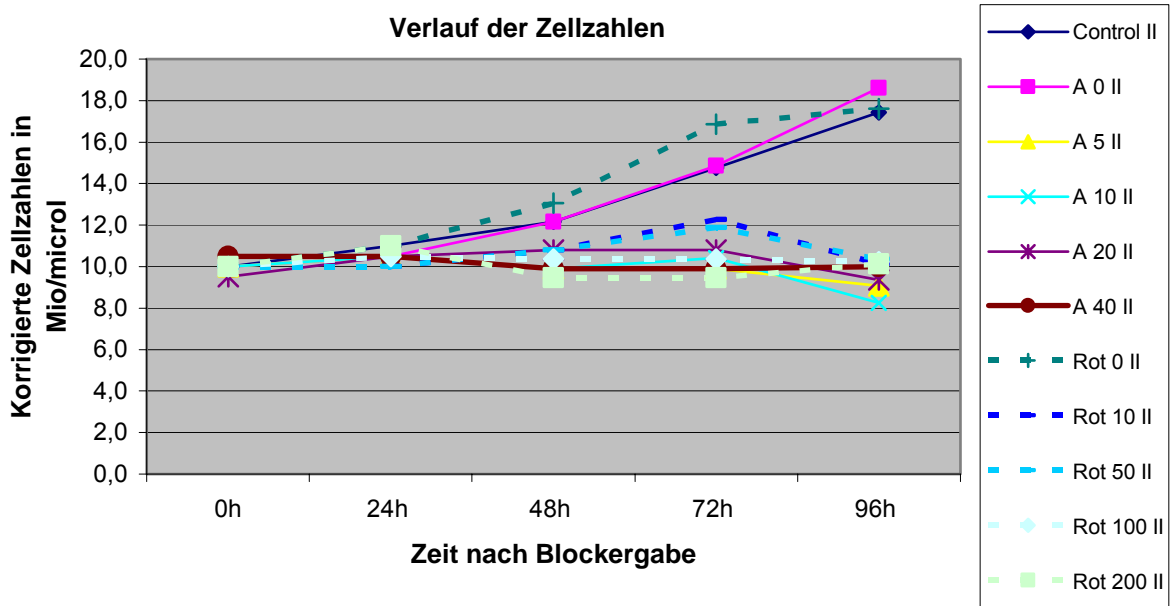


Abb. 3.17: Wachstumskurve der Mono-Mac-1-Zellen während des viertägigen Blockes mit Berücksichtigung des Zellverlustes durch Mediumwechsel. Das Nährmedium enthielt dialysiertes Serum. Die Atmungsketteninhibition bestand 96 h.

3.5.3 Nukleotidkonzentrationen nach zwei Tagen Blockerbehandlung

Die Zellen wurden drei Tage in dialysiertem Nährmedium kultiviert und dann zwei Tage mit Atmungsketteninhibitoren behandelt. Nach zwei Tagen Blockerbehandlung war ein leichter Rückgang der Uridintriphosphate und der Guanosinphosphate unter Antimycin A zu erkennen. Unter Rotenon sah man bei 100 nM und 200 nM eine Absenkung der Adenosin- und der Guanosinphosphate (Abb. 3.18). Allgemein zeigten die Zellansätze mit stärkerem Atmungskettenblock, Antimycin A und Rotenon, kein deutliches Absinken des Gesamtnukleotidpools. Der Rot 0-Ansatz, bezogen auf die Uridinphosphate nach zwei Tagen Rotenonbehandlung, wich von den anderen beiden Nullkontrollen stark ab. Eine fälschlicherweise zu hoch angegebene Zellzahl könnte der Grund für die niedrige UTP-Konzentration sein, was bei einer Zellzahl von 7,5 Mio im Gegensatz zu den anderen beiden Nullkontrollen mit Zellzahlen um 10 Mio eher etwas zu niedrig wäre.

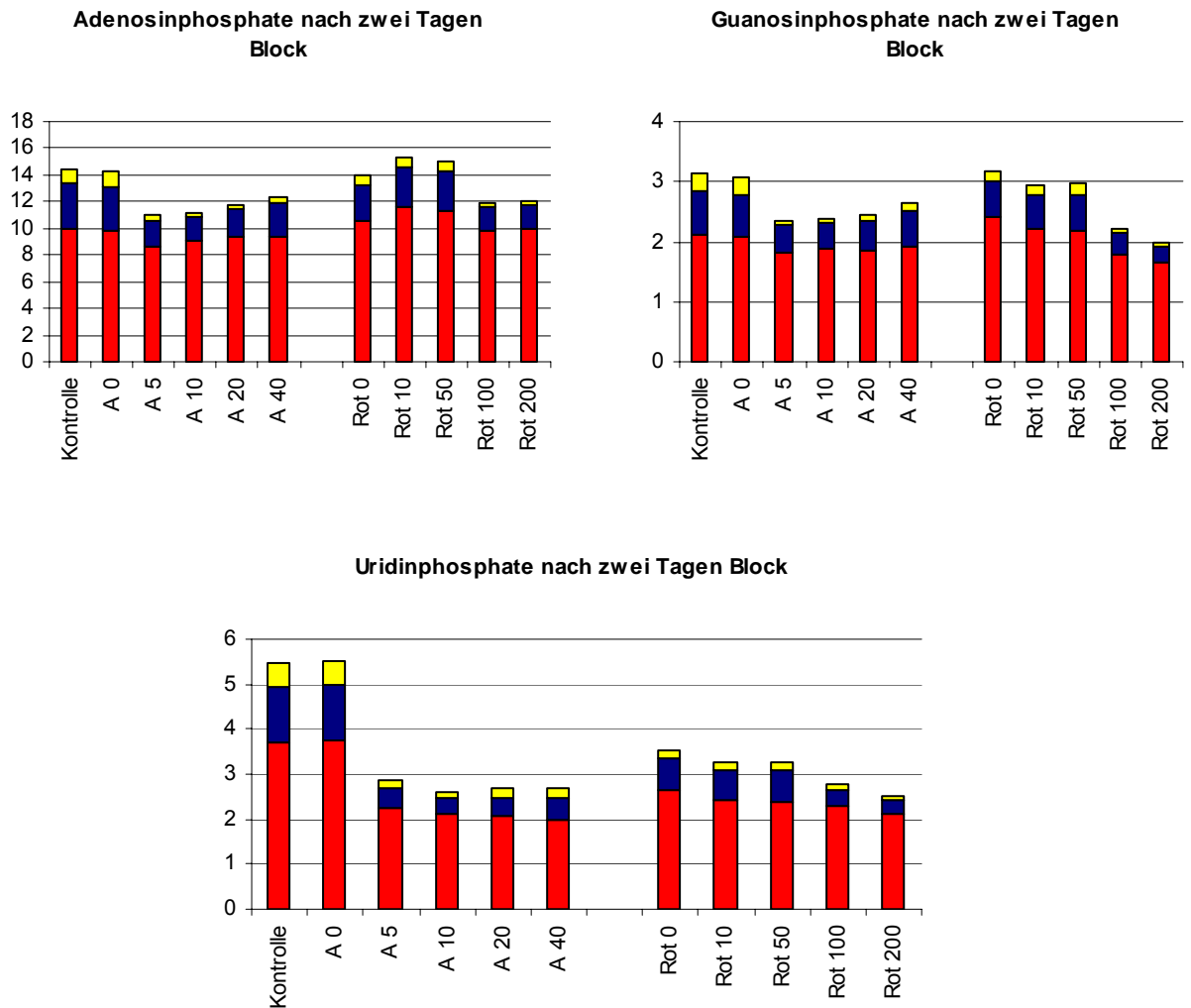


Abb. 3.18: Relative Nukleotidkonzentrationen in Mono-Mac-1-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der Atmungsketten-Inhibitoren Antimycin A oder Rotenon über 48 h behandelt wurden.

NMP = ■ ; NDP = ■ ; NTP = ■

A 0 und Rot 0: die Zellen wurden ohne Blocker, aber mit dem Lösungsmittel des Inhibitors (Ethanol) inkubiert.

3.5.4 Nukleotidkonzentrationen nach vier Tagen Blockerbehandlung

Die Zellen wurden drei Tage in dialysiertem Nährmedium kultiviert und vier Tage mit Atmungsketteninhibitoren behandelt.

Generell war kein deutliches Absinken der Uridinphosphate auch nach vier Tagen Blockade zu erkennen (Abb. 3.19), wie es in den vorhergehenden Experimenten mit Osteosarkomzellen und Keratinozyten der Fall gewesen war. Allerdings zeigte sich eine

Stagnation der Zellproliferation der mit Blockern behandelten Zellen, wogegen die drei Kontrollen sich in ihrer Zellzahl verdoppelten (Abb. 3.17).

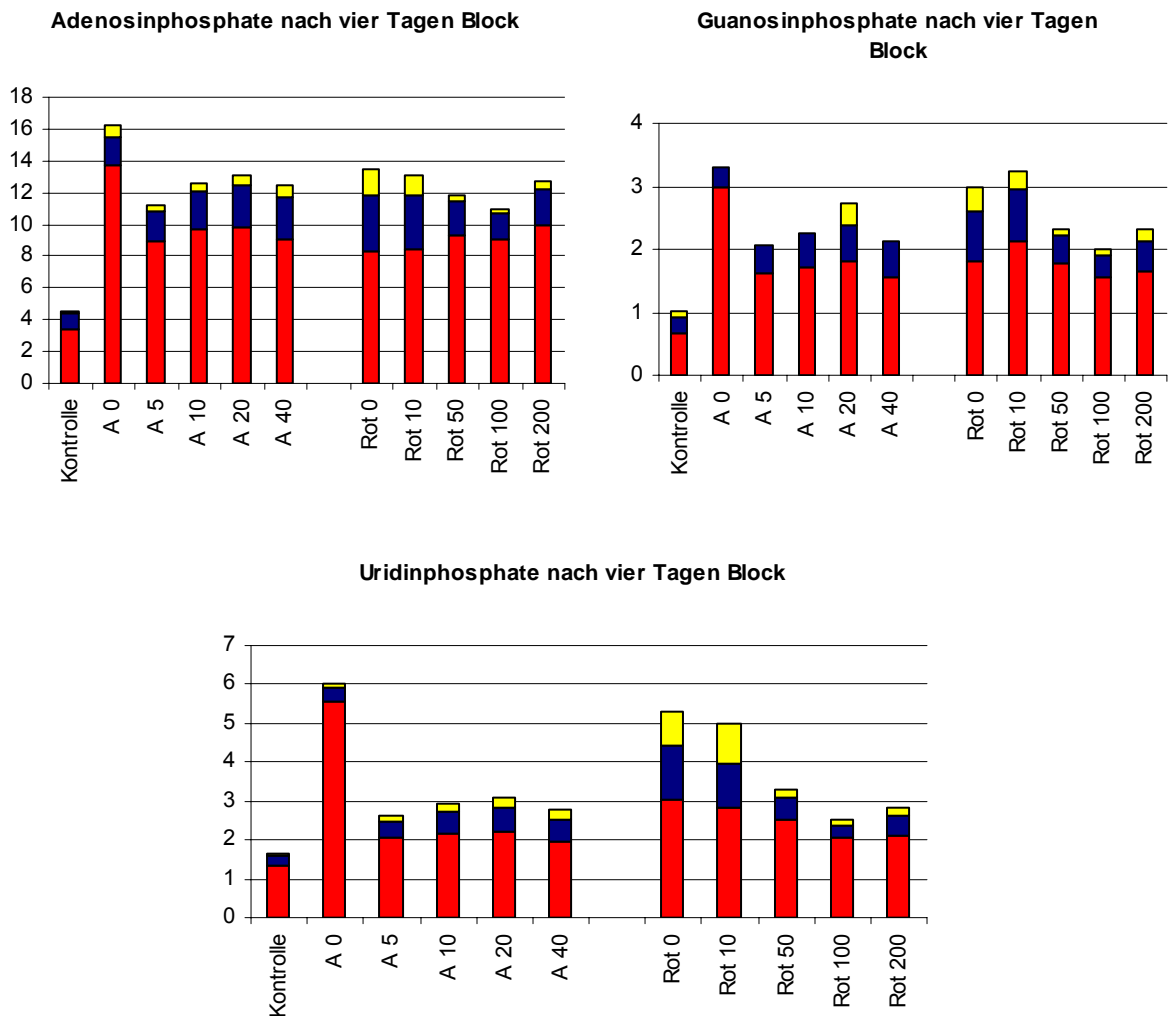


Abb. 3.19: Relative Konzentrationen der Mono-Mac-1-Zellen, die verschiedenen Konzentrationen an Atmungskettenblockern Antimycin A oder Rotenon für 96h behandelt wurden.

NMP = ■ ; NDP = ■ ; NTP = ■

Bei dieser Extraktion wurde beim Herauswaschen der TCA Diethylether von einem anderen Anbieter verwendet. Bei den Kontrollen K und A 0 wurden zur Extraktion zu wenige Zellen verwendet.

Es wurden wiederholt Mono-Mac-1-Zellen kultiviert und bei aufsteigender Konzentration von Atmungsketteninhibitoren inkubiert. Diesmal erfolgte hauptsächlich die tägliche Messung der Glucosekonzentrationen und pH-Werte der behandelten Zellkulturen. Schon nach zwei Tagen nach Inhibitoreninkubation sahen die Medien der Kulturen gelb aus, der Farbindikator war bei den Nullkontrollen braun und färbte sich dosisabhängig bis zu den Kulturen mit höheren Blockerkonzentrationen (A 5 bis A 40) über dunkel gelb bis gelb.

Deutlich fiel auf, dass die Glucosekonzentrationen von der Behandlungsdauer und -dosis abhängig abnahmen. Ähnlich verhielten sich die pH-Werte. Als pH-Wert des puren Nährmediums ließ sich 7,5 bestimmen. In einigen behandelten Zellkulturen wurden pH-Werte von 8,5 gemessen (Abb.: 3.20).

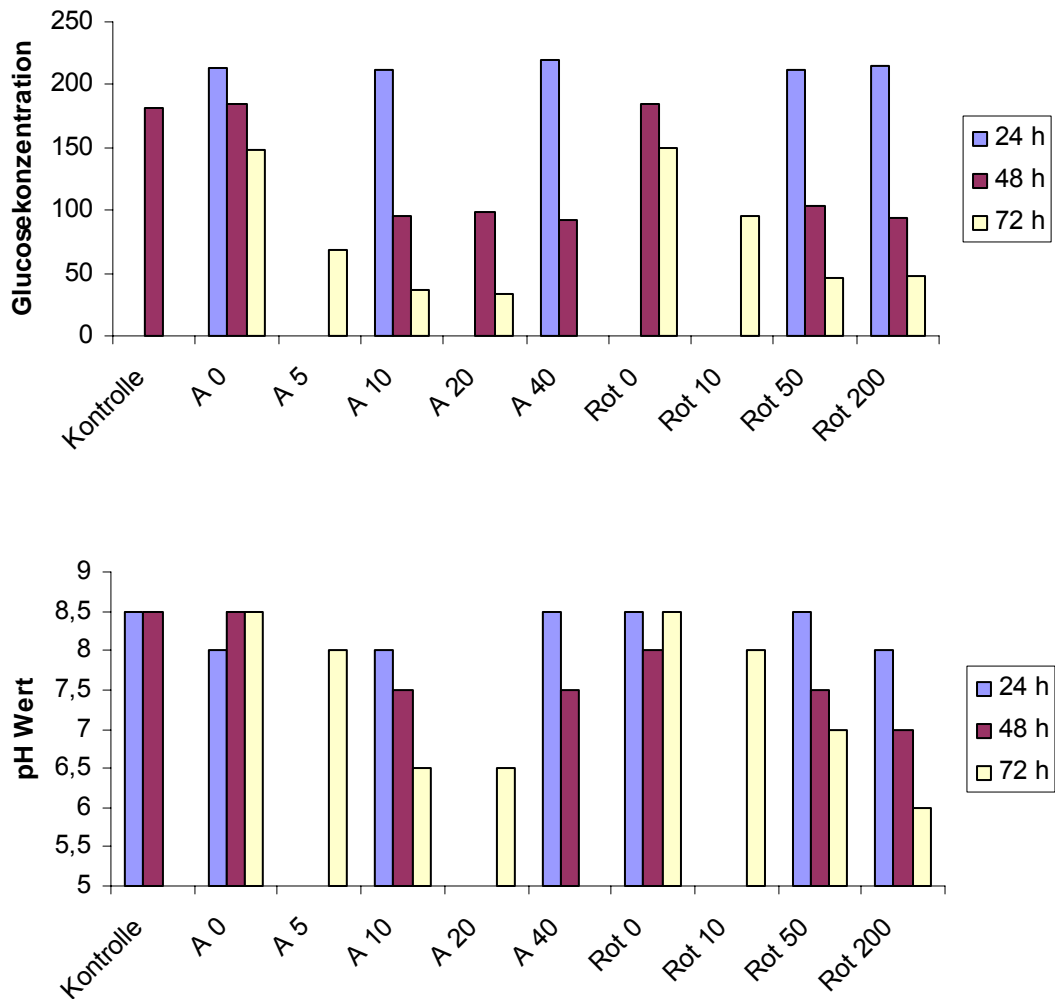


Abb. 3.20: Die Entwicklung der Glucosekonzentrationen (mg/dl) und der pH-Werte wurde 72 h während der Blockerbehandlung gemessen. Glucosekonzentration des Nährmediums: 235 mg/dl, pH-Wert des Nährmediums: 7,5.

3.6 Knochenmark von Patienten mit AML, MDS, NHL, T-ALL, CML

Normales Knochenmark:

Nukleotidkonzentrationen wurden auch in Knochenmarkszellen von Patienten mit unterschiedlichen MDS-Typen (Tab. 3.5) ermittelt. Zum Vergleich wurden Knochenmarkszellen eines Patienten in kompletter Remission nach Therapie eines multiplen Myeloms untersucht, sowie Zellen von drei weiteren Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, deren Knochenmark beim Staging keine Lymphominfiltration aufwies.

Die relativen Nukleotidkonzentrationen aus den vier Kontrollen (Abb. 3.21) wurden auf der Grundlage des NAD-Spiegels bestimmt und aus den berechneten Werten die Durchschnittswerte ermittelt. Die Nukleotidkonzentrationen in normalen Knochenmarkszellen ähnelten denen unbehandelter T-Lymphozyten. Dagegen liegen die Nukleotidkonzentrationen in Keratinozyten um das 20-fache höher. Die Kontrollen zeigen eine deutliche Variabilität. Da die CMP- und CDPE-Gipfel in den ersten 3 min zusammen mit anderen Abbauprodukten aus Nukleotiden eluierten, konnten ihre Konzentrationen nicht sicher bestimmt werden (Dr. Simmonds, London, persönliche Mitteilung).

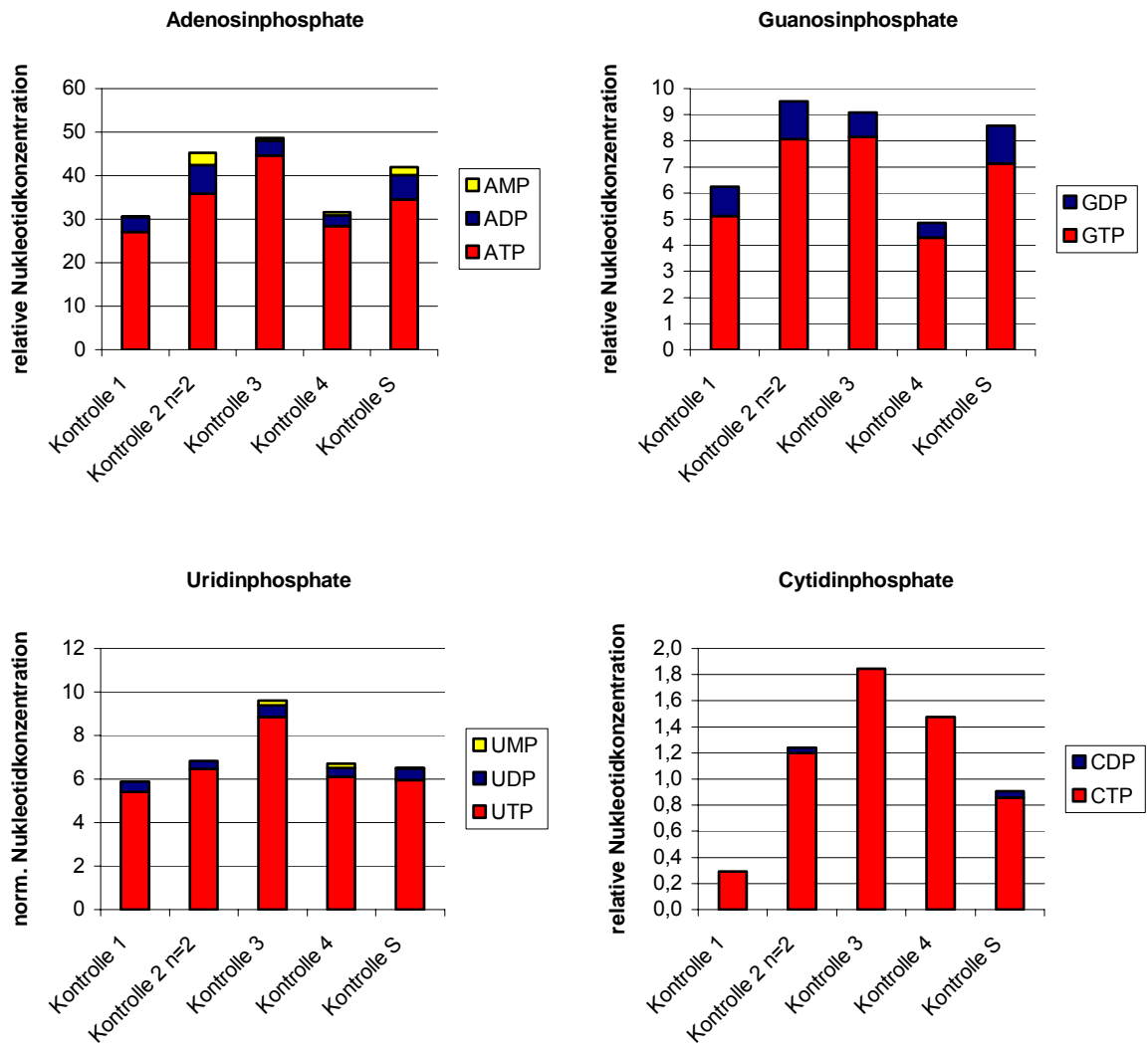


Abb. 3.21: Die relativen Nukleotidkonzentrationen in normalen mononukleären Knochenmarkszellen im Vergleich mit Kontrollen von Dr. Simmonds (S). Der CDPE-Wert konnte in einigen Proben aus methodischen Gründen nicht ermittelt werden.

Kontrolle 1 : Patient (58) mit gesundem KM nach kompletter Remission eines MM

Kontrolle 2 n=2: Patient (66) mit geringgradiger Infiltration des KM durch
niedrigmalignes NHL mit grenzwertigem Anteil lymphatischer Zellen.

Kontrolle 3 : Patientin (52) ohne Anhalt für eine KM-Infiltration durch NHL

Kontrolle 4 : Patientin (76) ohne Anhalt für eine KM-Infiltration durch NHL

Kontrolle S : Von Dr. Simmonds ermittelte Durchschnittswerte von 4 Patienten mit gesundem KM.

Tab. 3.5: Charakteristika untersuchter Probanden

Nr	Patient	Alter	Befund	Klinische Angaben	Datum der Material-gewinnung
1	P. P(m)	58	Gesundes KM	Komplette Remission eines MM, normozellulär	12.03.2002
2	P. H (m)	66	Gesundes KM	Geringgradige Infiltration des KM durch niedrigmalignes NHL	06.05.2002
3	S. G (w)	52	Gesundes KM	Keine KMInfiltration bei NHL	05.06.2003
4	K. H (w)	76	Gesundes KM	Keine Kminfiltration, bei NHL	12.06.2003
5	W. N (w)	71	MDS RA	MDS RA, 3% Blasten, RS <1%, komplexer Karyotyp, megaloblastäre Veränderungen, AML Exitus letalis 07/03	04.03.2003
6	S. G (w)	67	MDS RA	MDS RA, normozelluläres KM, vermehrtes SpeicherFE, megaloblastäre Veränderungen, 12%der Normoblasten sind Ringsideroblasten	05.07.2002
7	P. H (m)	70	MDS RA nach FTI	MDS RA, 3% Blasten, megaloblastäre Veränderungen, ED 01/02 RAEB I, 07/02 RAEB II, dann Thalidomidtherapie	26.11.2002
8	N. D (m)	64	MDS RA unter Thalidomid	Ausgeprägte megaloblastäre Veränderungen, ED 05/99, immunsuppressive Therapie dann Danazol ohne Ansprechen, 01/00 mit Thalidomid sehr gutes Ansprechen Transfusionsfreiheit,	11.07.2003
9	N. C (w)	78	MDS RA5q-	MDS ED 99, del 5q31 etwa 20 % der Zellen, MGUS Typ IgG Lambda.	10.04.2002
10	L. F (w)	48	MDS RA5q-	MDS	13.05.2002
11	C. K (m)	63	MDS RA5q-	MDS RA, 5% Blasten, Trisomie 8,	24.10.2002
12	K. S (w)	32	MDS RARS	MDS RARS, 40% Ringsideroblasten, megaloblastäre Veränderungen, ED 09/01, Nachtschweiß seit > 1a, 46, XX del 14q, wegen Anämie mit Erythropoetin behandelt.	04.06.2003
13	K. R (w)	83	MDS RARS	MDS RARS, SpeicherFE im Retikulum massiv vermehrt, 68% RS, ED 11/01 RA	08.05.2003
14	W. H (m)	62	MDS RAEB I, 5q-	MDS RAEB I, megaloblastäre Veränderungen, 6% Blasten, SpeicherFe vermehrt, keine RS.	14.03.2003

Nr	Patient	Alter	Befund	Klinische Angaben	Datum der Materialgewinnung
14	W. H (m)	62	MDS RAEB I, 5q-	MDS RAEB I, megaloblastäre Veränderungen, 6% Blasten, SpeicherFe vermehrt, keine RS.	14.03.2003
15	M. H (m)	79	MDS RAEB T	MDS RAEB II, 12%Blasten, 10% RS, ED 06/02, komplexer Karyotyp, folgende Thalidomidtherapie	9.07.2002
16	P. H (m)	69	MDS RAEB II	MDS RAEB II ED 01/02, 15% Blasten, keine RS, megaloblastäre Zellformen, ED RAEB I (5% Blasten)	14.06.2002
17	P. R (m)	72	MDS RAEB II	MDS RAEB II, massiv gesteigerte Zellularität, 2%Blasten vom Typ II, ED 06/02, normaler Karyotyp, FTI ohne Ansprechen, maligner Pleuraerguss	22.04.2003
18	B. H (m)	67	MDS RAEB II	MDS RAEB II, V.a. Übergang in AML, 22% Blasten, SpeicherFE vermehrt, keineRS	12.07.2002
29	B. B (m)	60	MDS/AML	Die MNCs mit Polymorphprep gewonnen. Sek. AML aus RAEB-T ED 07/02, megaloblastäre Veränderungen, Doppelkernigkeit, 40%Blasten, komplexer Karyotyp, vakuolisierte Zellen, SpeicherFe vermehrt, leukämische Hautinfiltrate	17.07.2002
20	S. C (m)	62	MDS RAEB I AML M2	AML M2 aus MDS RAEB I ED 11/01, hyperzellulär, 30%Blasten(Typ1), mit 19% erhöhte Eosinophile, vermehrtes SpeicherFe, keine RS, Zytogenetik vom 10.5.02: Trisomie 8, megaloblastäre Veränderungen, ausgeprägte Anämie(MDS+Allo-AK), part. Remission am 31.05.02	11.04.2002
21	R. P (m)	44	MDS RA / AML M2	sek. AML M2 ED 4/02 aus MDS RA ED 09/01, Z.n. ATG/CSA Therapie 09/01 und nach ICE 04/02 Blastenpersistenz, normaler Karyotyp, hyperzellulär, megaloblastäre Veränderungen, 40%Blasten vornehmlich Typ I, keine RS, vermehrtes SpeicherFe.	11.04.2002
22	S. H(m)	75	MDS / AML M5	sek. AML M5, hyperzellulär, 40% Blasten, vermehrtes SpeicherFe, keine RS.	18.03.2002

Nr	Patient	Alter	Diagnose	Klinische Angaben	Datum der Materialgewinnung
23	F. H (w)	76	MDS RA / AML	Sek. AML aus MDS RA, 95% blastäre Zellelemente, MDS Progress bei Blasten im PB,	19.05.2003
24	E. J (m)	73	MDS / AML M2	Sek. undifferenzierte AML, vereinzelt megaloblastäre Zellen, 58% Blasten vom TYP I und II, MDS ED 05/01, 06/01 nach Therapie komplette Remission, AML-Rezidiv 04/03	16.06.2003
25	B. U (m)	38	AML M2	MNC aus dem peripheren Blut, AML M2, 57%Blasten Typ I, gelegentlich Auerstäbchen, auffällige Eosinophilie, Inversion 16, ED 11/02	19.11.2002
26	W. B (m)	75	AML M3	AML M3, Promyelozytenanteil von 18%, 59% Blasten vermehrt vom Typ II, Auerstäbchen, keine typischen Faggotzellen, keine Granulozytenreifung, SpeicherFe vermehrt, ED 03/03 AML M1, unauffälliger Chromosomensatz 46,XY, Einzelaberration mit Del. Am kurzen Arm des Chromosoms 7 = 7p	12.05.2003
27	F. I (w)	60	CML	in chron Phase, Philadelphia Chrom. pos., ED 04/02, ab 05/02 Glivec, Sjögren-Syn.	3.05.2002
28	M. H (w)	53	CML	MNC aus dem peripheren Blut, in chron. Phase, 2% Blasten, Leukos >232000/µl., Gewichtsverlust von 10kg in 3 Mon., seit 6 Mon. Nachtschweiß,	22.11.2002
29	S. H (m)	78	CML	In chron. Phase, 6% Blasten, P. vera ED 93,	19.12.2002
30	T. A (m)	67	P. vera	P. rubra vera	8.05.2002
31	K. S (m)	30	T-ALL	100%ige KMinfiltration durch Blasten, ED 02/03, Nachtschweißsymptomatik, Petechien, Hämaturie, rez. Epistaxis.	12.02.2003

Bei der Auswertung der Nukleotidkonzentrationen wurden verschiedene KM-Proben, die die gleiche Diagnose repräsentierten (Tab. 3.6), zusammengefasst, indem die Mittelwerte der relativen Nukleotidkonzentrationen berechnet wurden.

(Abb. 3.22).

Diagnosen	Anzahl der extrahierten KM Proben
Unauffälliger KM Befund	4
RA	4
RA 5q-	3
RARS	2
RAEB I	1
RAEB II	3
RAEB-T	1
sek.AML	6
AML M2	1
AML M3	1

Tab. 3.6: Zahlenmäßige Verteilung der untersuchten Knochenmarksproben auf die verschiedenen Krankheitstypen

Bei den MDS-Proben vom Typ RA unterschieden sich die Nukleotidkonzentrationen nicht wesentlich von denen der Kontrollen, außer bei den Cytidinphosphaten, deren relative Spiegel auf ungefähr das zweifache der Norm erhöht waren. Die Extrakte aus den RAEB-Proben zeigten niedrigere Nukleotidkonzentrationen als die Kontrollen (außer bei den Cytidinphosphaten). Bei primärer und sekundärer AML fiel auf, dass die Pyrimidinkonzentrationen annähernd normales Niveau hatten, während die Purinkonzentrationen vermindert waren. Das Verhältnis aus Uridin- und Guanosinphosphaten zeigte für die akuten Leukämien erhöhte Werte an (um 1,6-fach). Bis auf die RA-Proben lagen die Nukleotidkonzentrationen in den kranken KM-Proben im allgemeinen unterhalb des normalen Niveaus.

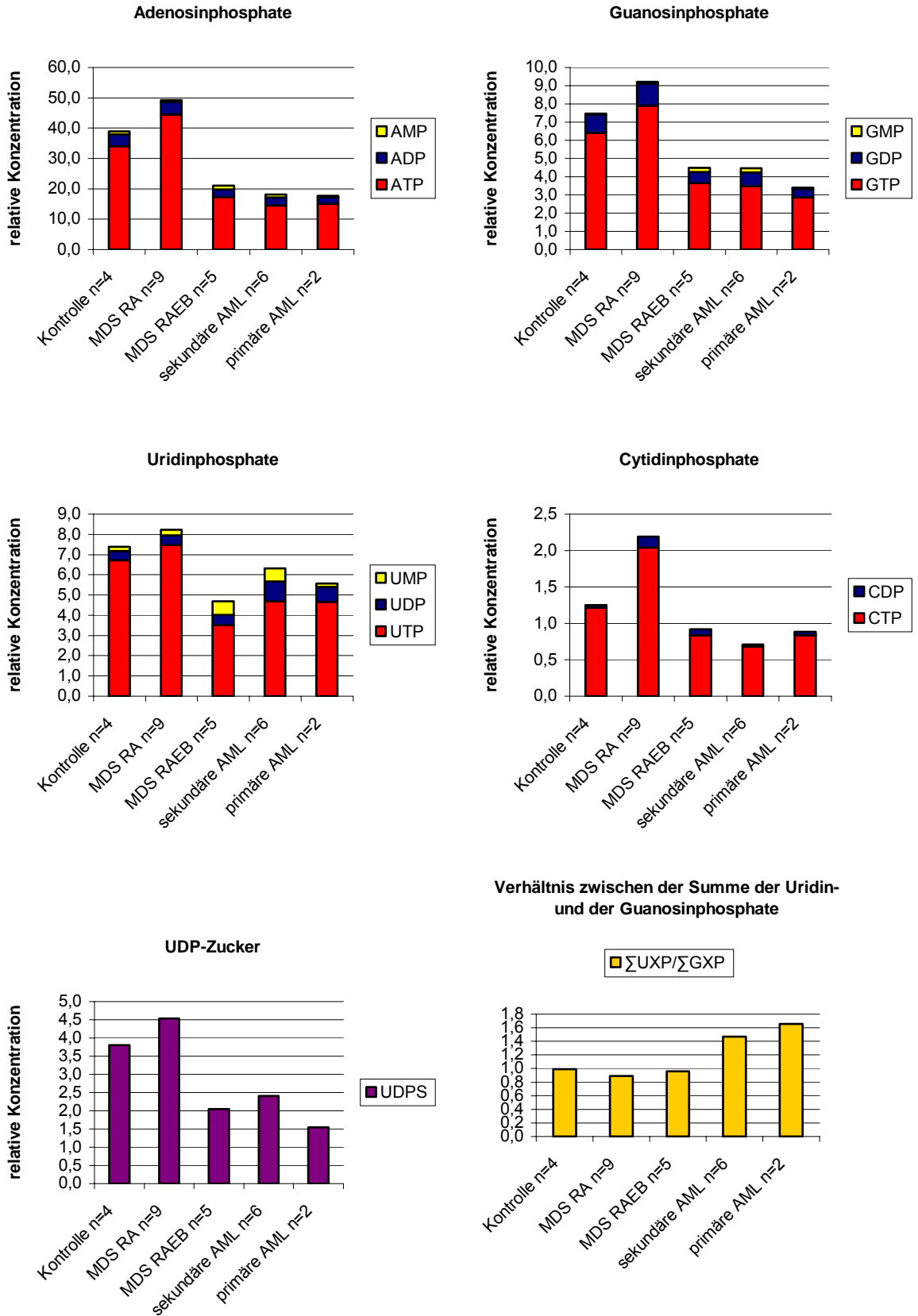


Abb. 3.22: Die Mittelwerte der relativen Nukleotidkonzentrationen bei den verschiedenen MDS-Typen im Vergleich zum gesunden und leukämischen Knochenmark.

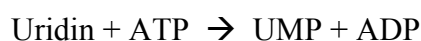
4 Diskussion

An der Neubildung von Pyrimidinnukleotiden ist das Enzym DHODH beteiligt, das sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet und Elektronen auf die Atmungskette überträgt. (Löffler *et al.*, 1997) (Abb. 1.2). Wegen der funktionellen Verknüpfung zwischen Atmungskette und DHODH könnten Mutationen der Mitochondrien-DNA, die zu Atmungskettendefekten führen, sich auch auf die de-novo-Synthese von Pyrimidinen auswirken. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette in vitro tatsächlich zu einer starken Abnahme der intrazellulären Pyrimidinkonzentrationen führte. Im Zusammenhang mit myelodysplastischen Syndromen sind diese Befunde von Interesse, da bei der Mehrzahl der MDS-Patienten klonal expandierte Mutationen der mtDNA vorliegen und die Knochenmarkszellen außerdem megaloblastäre Veränderungen aufweisen, die auf eine Störung des Nukleotidstoffwechsels hindeuten.

4.1 Nukleotidkonzentrationen in ρ^0 -Zellen (rho-0-Zellen)

In den Experimenten mit ρ^0 -Zellen, die keine mtDNA und deshalb keine funktionierende Atmungskette aufweisen, fiel auf, dass es bei fehlender externer Substitution von Uridin zu einem starken Konzentrationsabfall der *Pyrimidinnukleotide* und der UDP-Zucker kam. Im Vergleich dazu zeigten die *Purinnukleotide* keine wesentliche Änderung.

Bei externer Substitution mit Uridin können ρ^0 -Zellen ihren Pyrimidinbedarf über den *salvage pathway* decken, der jedoch ebenfalls energieabhängig ist. Die Energieladung, repräsentiert durch den Quotienten aus ATP und ADP, ist bei ρ^0 -Zellen mit einem Wert <1 relativ gering, verglichen mit 3-4 in Keratinozyten und bis ca. 2 in 143-B-Zellen. Dennoch können ρ^0 -Zellen auch bei niedriger Energieladung offenbar die Uridinkinase, das limitierende Enzym der Wiederverwertungsreaktion, ausreichend mit ATP versorgen und deshalb proliferieren. Die Uridinkinase benötigt ATP zur Synthese von UMP aus Uridin:



Rho-0-Zellen haben ihren Stoffwechsel erfolgreich dem mtDNA-freien Zustand angepasst. Obwohl das Fehlen einer funktionierenden Atmungskette zwangsläufig die Kapazität zur Energiegewinnung beeinträchtigt, können ρ^0 -Zellen eine ausreichende ATP-Regeneration durch Glykolyse aufrechterhalten. Normale, nicht-maligne Zellen könnten ohne intakte Atmungskette nicht überleben, sondern würden durch Apoptose zugrunde gehen.

Wahrscheinlich haben ρ^0 -Zellen ihre Apoptosefähigkeit verloren, entweder als direkte Folge des Atmungskettenverlustes oder sekundär durch Verlust bzw. Abschaltung proapoptotischer

Gene im Zellkern. Bei Inkubation mit BMD188, einem Mittel gegen das Prostata-Karzinom, zeigten ρ^0 -Zellen eine größere Apoptoseresistenz als Wildtyp-Zellen (Joshi *et al.*, 1999). BMD188 führt über eine vermehrte Synthese von Superoxidradikalen, Calciumüberladung und Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran zum Kollaps des Membranpotentials und über eine Caspasenaktivierung zur Apoptoseinduktion. Auch nach Einwirkung ionisierender Strahlung zeigten ρ^0 -Zellen eine geringere Apoptoseaktivität (Tang *et al.*, 1999).

4.2 Wirkung von Antimycin A und Rotenon auf die Nukleotidkonzentrationen

Ähnlich wie in den Experimenten mit ρ^0 -Zellen unter Uridinentzug führte die Inhibition der Atmungskette bei 143B-Zellen und Keratinozyten nicht zu einem Absinken der Gesamtkonzentration der Purine. Allerdings erfuhren die Purine in diesen Zellen nach Antimycin A- oder Rotenonblockade eine deutliche Umverteilung von den energiereichen Triphosphaten zu Di- und Monophosphaten, sicher als Folge der beeinträchtigten mitochondrialen ATP-Regeneration. Der Atmungskettenblock durch Antimycin A im Komplex III führte zu einer Abnahme der Pyrimidine und UDP-Zucker und verdeutlicht somit die Relevanz einer funktionierenden Atmungskette für die Funktion der DHODH und die Synthese von UTP und daraus entstehenden UDP-Zuckern.

Die in unseren Experimenten ermittelten Nukleotidkonzentrationen in Osteosarkomzellen zeigen die Hochregulierung der Nukleotidsynthese in malignen Zellen. Besonders die Pyrimidine und deren Zucker kommen in Osteosarkomzellen im Vergleich zu Keratinozyten in erhöhten Konzentrationen vor. Die Uridinphosphatspiegel machen das zweifache und die Cytidinphosphatspiegel das fünffache der Konzentrationen in Keratinozyten aus, die UDP-Zuckerkonzentrationen sind um das vierfache gesteigert (Lynette D. *et al.*, 1995). Bei der erhöhten Synthese des CTP aus Uridinnukleotiden scheint UTP eine wesentliche Rolle zu spielen. Die CTP-Synthetase ist eines der Enzyme, die in maligne entarteten, stark proliferierenden Zellen hohe Aktivitäten aufweisen. Für die CTP-Synthese verwenden normale Zellen, wie Lymphozyten und Fibroblasten, nicht den Syntheseweg über die Uridinphosphate, sondern den Weg über eine Wiederverwertungsreaktion, in der das Ribonukleosid Cytidin unter ATP-Umsetzung zu CMP umgewandelt wird, aus dem dann auch CTP regeneriert wird. (Van den Berg *et al.*, 1994).

Unerwartet wurden die Pyrimidinkonzentrationen gleichermaßen durch Rotenon wie durch Antimycin A dezimiert. Unerwartet deshalb, weil Rotenon die Atmungskette im Komplex I,

also weit proximal, hemmt und deshalb den Elektronentransfer von DHODH auf Coenzym Q eigentlich nicht behindern dürfte.

Die bekannte Wirkung des Rotenons auf Komplex I bietet zwar keine direkte Erklärung für die Hemmung der de-novo-Pyrimidinsynthese, führt jedoch zu einer Behinderung des Elektronenflusses durch den Komplex I und kann damit die Energiegewinnung stören. Bis zu einer Rotenonkonzentration von 100 nM nimmt die Hemmung des Komplex I zu und damit die Atmungskettenaktivität ab. Eine Erhöhung der Rotenonkonzentration über 100 nM bewirkt keine stärkere Blockade des Komplex I mehr, führt aber zum Absterben der Zelle. Bei Rotenonkonzentrationen über 100 nM ist immer noch ein Elektronenfluss in der Atmungskette nachweisbar, der wahrscheinlich über den Komplex II aufrechterhalten wird (PD Dr. Hofhaus, Biochemisches Institut der HHU, persönliche Mitteilung).

Für die de-novo-Synthese eines Nukleotids UMP werden zwei Moleküle ATP benötigt. Unsere Experimente an 143B-Zellen und Keratinozyten zeigten sowohl unter Rotenon als auch Antimycin A eine Umverteilung von Adenosintriphosphaten zu Monophosphaten, also Auswirkungen eines Energiemangels.

Im Hinblick auf einen zellulären Energiemangel ist zu berücksichtigen, dass die ATP-verbrauchenden Prozesse hierarchisch geordnet sind. Die nicht dringend für das unmittelbare Überleben der Zelle benötigten Reaktionen werden zuerst aufgegeben. Am sensibelsten reagiert die Biosynthese von Makromolekülen wie Proteinen und RNA/DNA auf Energiemangel (Buttgereit F and Brand M, 1995). Es ist nicht genau bekannt, wo sich die ATP-abhängigen Reaktionsschritte (Abb. 4.1) der de-novo-Pyrimidinsynthese in diese Hierarchie einordnen.

Aber auch das Argument einer gestörten ATP-Synthese erlaubt uns nicht, die Hemmung der Pyrimidinsynthese durch Rotenon auf eine Hemmung des Komplex I zurückzuführen. Dann hätten nämlich auch die mutierten Zellen mit spezifischem Komplex-I-Defekt eine Abnahme der Pyrimidinkonzentration zeigen müssen. Aufgrund dieser Überlegungen lässt sich die von 10 nM bis 200 nM dosisabhängige Rotenon-vermittelte Senkung der Pyrimidinkonzentrationen nicht schlüssig durch Hemmung der Atmungskette im Komplex I erklären.

Als alternativen Erklärungsansatz für die starke Abnahme der Pyrimidinkonzentration unter Rotenon könnte man postulieren, dass Rotenon diesen Effekt weniger durch seine Wirkung auf Komplex I, sondern eher über andere Mechanismen erzielt. Da Rotenon gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zum Coenzym Q hat, wäre es denkbar, dass Rotenon innerhalb der mitochondrialen Membran mit Ubichinon um die Interaktion mit DHODH konkurriert.

Rotenon hätte dann bezüglich der Pyrimidinsynthesehemmung eine ähnliche Wirkung wie der Atmungskettenblock mit Antimycin A. (Abb. 1.2 und 4.2).

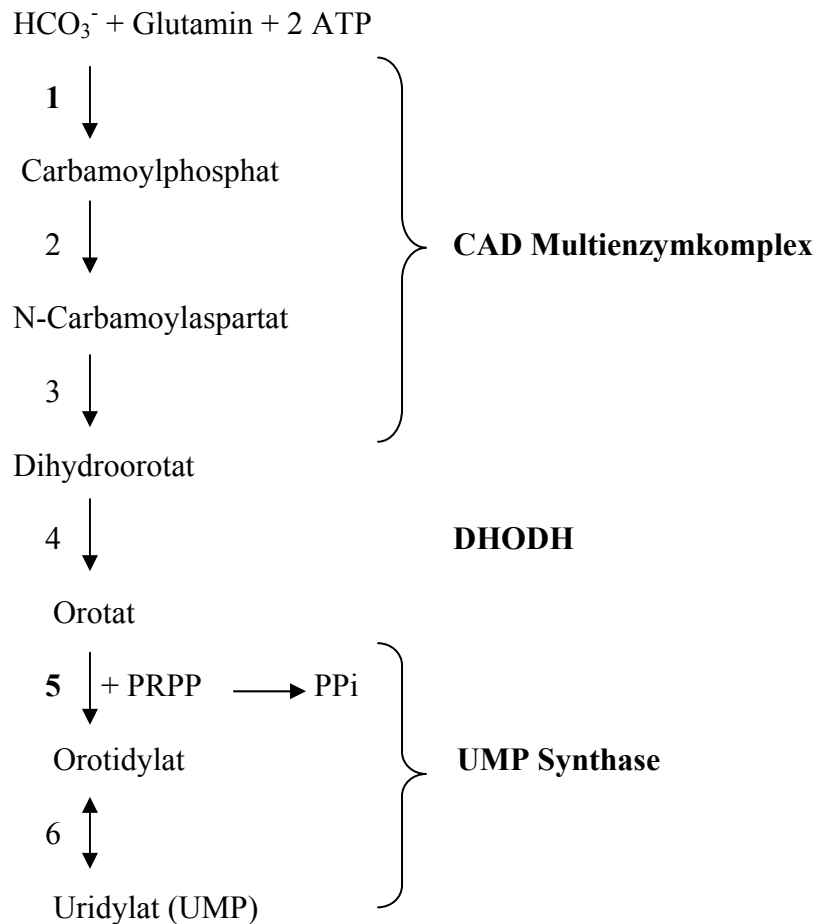


Abb. 4.1: Die de-novo-Pyrimidinbiosynthese besteht aus sechs Reaktionsschritten, von denen der erste und der fünfte ATP-abhängig katalysiert werden (Stryer, Biochemie 4. Auflage, S. 785 pp., 1995)

1 Carbamoylphosphat-Synthetase, 2 Aspartat-Transcarbamylase, 3 Dihydroorotase,
4 Dihydroorotatdehydrogenase, 5 Orotat-Phosphoribosyl-Transferase, 6 Orotidylat-Decarboxylase

Die Rotenonbehandlung an Keratinozyten und 143B-Zellen führte zu einer deutlichen Umverteilung der *Purin*triphosphate zu Monophosphaten. Wahrscheinlich ist diese Wirkung auf beeinträchtigte ATP-Regeneration zurückzuführen. Bei den Pyrimidinen war dieser Effekt nicht zu erkennen, möglicherweise weil er durch die drastische Absenkung der Pyrimidin-Gesamtkonzentration überdeckt wurde.

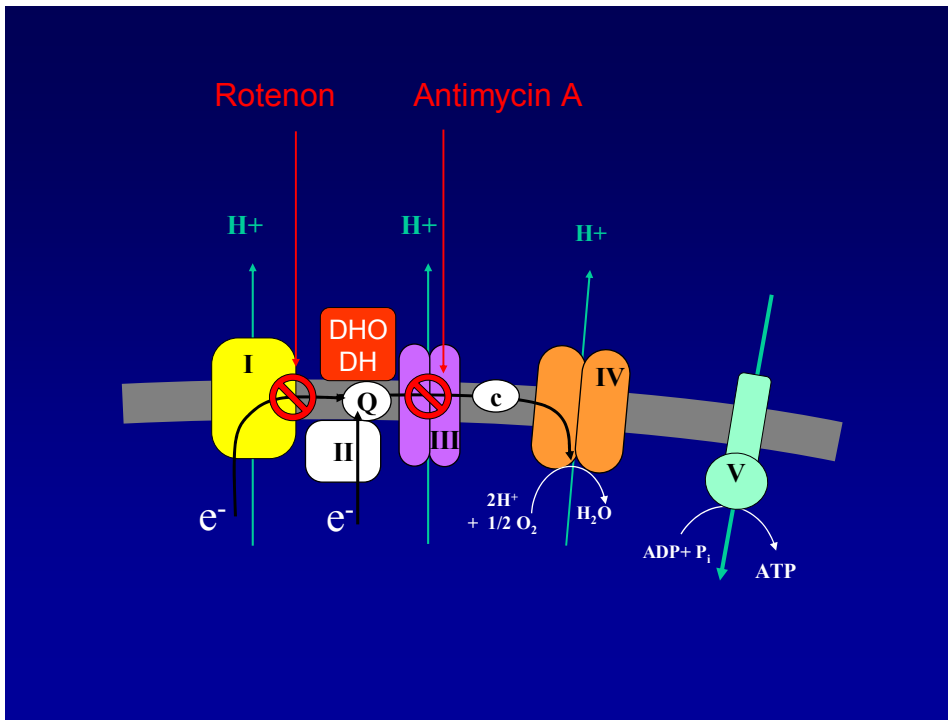


Abb. 4.2: Die Bindungsstellen des Rotenons und des Antimycin A

4.3 Wirkung der Atmungskettenblockade auf Mono-Mac-1-Zellen

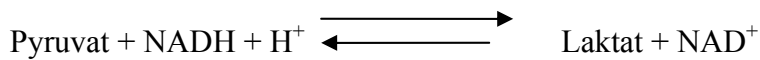
Nachdem die Atmungskettenblockade in Osteosarkomzellen und Keratinozyten ein Ungleichgewicht der Nukleotide bewirkt hatte, erwarteten wir ähnliche Effekte in menschlichen Knochenmarkszellen und behandelten deshalb Mono-Mac-1-Zellen, eine humane Leukämiezelllinie aus einer AML M5, in vitro mit Antimycin A und Rotenon.

Atmungskettenblockade über 96 h ohne Nährmediumwechsel:

Die 24-stündige Inkubation mit Atmungskettenblockern führte im Gegensatz zu den vorhergehenden Experimenten hier nicht zu einem Rückgang der Zellzahl. Allerdings zeigte sich in späteren Versuchen, die mit hohen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt wurden, durchaus ein beeinträchtigtes Wachstum gegenüber der Nullkontrolle, wodurch die Wirksamkeit der Blocker nachgewiesen wurde. Da die gewählte Inkubationszeit von 24 h möglicherweise zu kurz war und die Zellen deshalb noch ausreichende Nukleotidreserven hatten, wurde der Versuch mit einer längeren Inkubationszeit wiederholt.

Nach drei bis viertägiger Inhibition wurde das Nährmedium sauer, erkennbar an der Gelbfärbung des Farbindikators. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es bei gehemmter Atmungskette zu einem Rückstau von NADH kommt. Deshalb kann Pyruvat aus der Glykolyse nicht mehr in den Citratzyklus eingeschleust werden, sondern wird von der

Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert, welches das Medium ansäuert. Die Regenerierung des NAD^+ bei der Reduktion von Pyruvat zu Laktat hält den Ablauf der Glykolyse aufrecht.



Die Energiegewinnung durch Glykolyse scheint ausreichend zu sein, da die Nukleotidanalysen keinen drastisch verminderten ATP/ADP-Quotienten ergaben. Deshalb dürfte Energiemangel nicht die Erklärung für das Sistieren des Zellwachstums sein. Es ist denkbar, dass die Laktatazidose des Mediums zu einer Proliferationshemmung der Zellen führte, wobei jedoch eine pH-Absenkung des Mediums nicht obligatorisch den Zelltod provoziert. Schließlich könnte auch eine Störung der Pyrimidinsynthese zu einer Wachstumsstagnation geführt haben. Allerdings waren die Nukleotidkonzentrationen nach viertägiger Atmungsketteninhibition unverändert, was wir auf das nicht dialysierte fetale Kälberserum zurückführen, welches wahrscheinlich ausreichend Nukleoside, Uridin und Hypoxanthin für die Wiederverwertungsreaktion der Nukleotidsynthese enthielt.

Aus einigen Studien ist bekannt, dass der *salvage pathway* nicht immer ausreicht, um eine rege Zellproliferation zu gewährleisten. Als Beispiel sind hier die aktivierten T-Lymphozyten bei rheumatischen Erkrankungen zu erwähnen, die eine wichtige pathophysiologische Rolle spielen (Rückemann *et al.*, 1998). DHODH-Inhibitoren wie Leflunomid und Brequinar führen durch Suppression der de-novo-Pyrimidinsynthese zu einer Proliferationshemmung der T-Lymphozyten. Folglich ist die Wiederverwertung von Uracil und Nukleosiden nicht immer in der Lage, in ausreichender Menge Pyrimidine für die Zellproliferation zur Verfügung zu stellen.

Purin- und Pyrimidinbasen bzw. die entsprechenden Nukleoside fallen beim intrazellulären Abbau von Nukleinsäuren an, wie sie z.B. bei mRNA-turnover entstehen könnten. Außerdem werden sie bei der intestinalen Resorption von Nahrungsstoffen in den Organismus aufgenommen, wie die erfolgreiche orale Verabreichung von Uridin bei der hereditären Orotazidurie zeigt. Das zugeführte Nukleosid, 2–4 g pro Tag, deckt über den *salvage pathway* den Bedarf der Zelle, so dass sich die Krankheitssymptome zurückbilden (Löffler/Petrides, 2003). Zu berücksichtigen ist, dass nicht nur die DNA-Synthese, sondern auch der Aufbau von Zellmembranen die Mitwirkung von UDP-Zuckern und damit eine intakte de-novo-Pyrimidinsynthese erfordert (Fairbanks *et al.*, 1995).

Das letzte Experiment mit Antimycin A und nicht-dialysiertem Serum zeigt, dass die Pyrimidinkonzentration der Zellen, die mit verschiedenen Blockerkonzentrationen behandelt wurden, keine Veränderung erfuhr. Im Gegensatz dazu sieht man eine starke dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums. Die Cytidinphosphat-Konzentrationen waren erhöht.

Stark proliferierende Zellen können sich Cytidinphosphat-Reserven anlegen. Dabei katalysiert das Enzym CTP-Synthetase die Konversion von UTP zu CTP. Es wurde bereits in maligne entarteten Zellen, unter anderem in akuten nicht-lymphatischen Leukämiezellen gezeigt, dass die CTP-Synthetase hohe Aktivitäten aufwies (Verschuur *et al.*, 2000). CTP ist wichtig für den Aufbau der CDP-Fette, die zur Synthese von Membranstrukturen und für Protein oder Lipidglykosylierung in stark proliferierenden Zellen verwendet werden.

Die zelluläre ATP-Konzentration blieb in unseren Versuchen konstant, wahrscheinlich wegen ausreichender glykolytischer ATP-Regeneration. Mit frischem Medium wurde den Zellen regelmäßig Glukose zugeführt. Eigentlich war unter diesen Bedingungen kein Rückgang der Zellzahl zu erwarten, da die Zellen im nicht-dialysiertem Kulturmedium auch die Möglichkeit hatten, Nukleotide aus dem Medium aufzunehmen.

Zellen unter Atmungskettenblockade bei Verwendung von dialysiertem Serum im Nährmedium (keine externe Zufuhr von Nukleosiden):

Die Zellzahlen der mit Antimycin A und Rotenon behandelten Kulturen nahmen nur unwesentlich ab, es zeigte sich aber eine Wachstumsstagnation. Diese könnte theoretisch auf folgenden Faktoren beruhen:

1. ATP-Mangel, der jedoch durch die Bereitstellung von frischem Nährmedium an jedem zweiten Tag verhindert werden sollte. Regelmäßige Messung zeigten ausreichende Konzentrationen von Glukose für die glykolytische ATP-Gewinnung, so dass Energiemangel als Ursache der Wachstumsstagnation unwahrscheinlich ist;
2. Übersäuerung der Zellsuspension, die jedoch durch Mediumwechsel an jedem zweiten Tag verhindert wurde.
3. Beeinträchtigung der de-novo-Pyrimidinbiosynthese, die zu einem deutlichen Absinken des zellulären Nukleotidpools führen müsste. Die Konzentrationen der Pyrimidinnukleotidkonzentrationen sanken im Experiment jedoch nur unwesentlich ab.
4. Hohe Apoptoserate, die trotz Zellproliferation eine Nettozunahme der Zellzahl verhindert. Ursache hierfür könnte eine Störung des mitochondrialen Transmembranpotentials sein, ausgelöst durch die Atmungskettenblockade.

Mögliche Gründe für die nicht absinkenden Uridinphosphatkonzentrationen unter Atmungsketteninhibition:

Generell war kein deutliches Absinken der Uridinphosphate nach viertägiger Atmungsketteninhibition zu erkennen (Abb. 3.18). Möglicherweise adaptieren sich Tumorzellen durch folgende Mechanismen:

1. Reduktion der Zellproliferation, um den Nukleotidpool im Normbereich zu halten.

Dies könnte die konstanten Zellzahlen erklären.

2. Deckung des Nukleotidbedarfs durch Aktivierung der Wiederverwertungsreaktion und intrazelluläres Recycling von RNA- und DNA-Abbauprodukten

3. Recycling von Nukleotiden, die aus abgestorbenen Zellen ins Medium freigesetzt wurden.

Das Histogramm bei der elektronischen Zellzählung zeigte einen substantiellen Anteil an Zelldetritus.

Ein technisches Problem sollte ebenfalls bei der Bestimmung der Uridinkonzentrationen berücksichtigt werden. Absterbende Zellen können *apoptotic bodies* bilden, die durch den Coulter Counter als mehrere Teilchen gezählt werden, so dass sich eine zu hohe Zellzahl ergibt, die dann rechnerisch in einer geringeren Nukleotidkonzentration pro Zelle resultiert. Andererseits werden nekrotisch zugrundegegangene Zellen womöglich gar nicht von der Zählmaschine erfasst, wodurch dann eine höhere Nukleotidkonzentration in den registrierten Zellen resultieren würde. In den nachfolgenden Experimenten wurde deshalb vor der Nukleotidextraktion eine Lymphoprep-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, um tote Zellen oder Zellbestandteile zu entfernen. Neben dem beabsichtigten Vorteil ergibt sich hierbei jedoch der potentielle Nachteil, dass man bevorzugt die am wenigsten beeinträchtigten Zellen gewinnt, also jene, denen es durch die oben aufgeführten Mechanismen gelungen ist, ihre Pyrimidinkonzentrationen trotz Atmungsketteninhibitorbehandlung konstant zu halten. Idealerweise sollten natürlich solche Zellen bezüglich ihres Pyrimidinpools untersucht werden, die infolge der Atmungskettenblockade ein Nukleotidungleichgewicht aufweisen und dieses nicht kompensieren können.

4.4 Nukleotidkonzentration in Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS und AML

Wenn die bei MDS nachweisbaren Mutationen der mtDNA eine Atmungskettendysfunktion verursachen, könnte dies unter anderem zu beeinträchtigter de-novo-Pyrimidinsynthese führen, was die megaloblastären Veränderungen der Knochenmarkszellen erklären würde. Außerdem wäre bei einem Ungleichgewicht zwischen Purin- und Pyrimidinnukleotiden die Wahrscheinlichkeit fehlerhafter Replikation und Reparatur nukleärer DNA erhöht, mit der Folge einer gesteigerten Mutationsrate (Kunz *et al.*, 1994). Diese genetische Instabilität wiederum könnte zum Risiko der leukämischen Transformation beitragen (s. Abb. 4.3). Es ist jedoch ungeklärt, ob in den Knochenmarkszellen bei MDS tatsächlich ein Nukleotidungleichgewicht vorliegt.

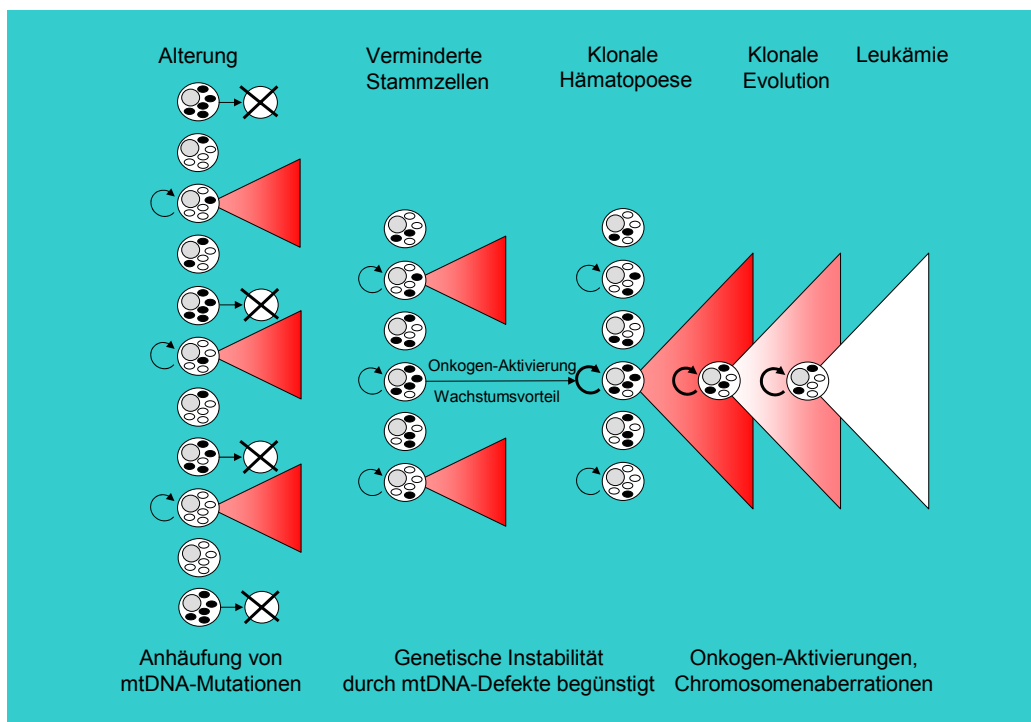


Abb. 4.3: Mögliches Modell der MDS Pathogenese nach Gattermann N.

Unsere Untersuchungen an Knochenmarkszellen bei Patienten mit MDS und AML ergab keine eindeutigen Veränderungen der Nukleotidkonzentrationen. Es fiel jedoch auf, dass das Verhältnis aus der Summe der Uridin- und der Guanosinphosphate für die akuten Leukämien um den Faktor 1,6 erhöht war. Erhöhte Uridinkonzentrationen in proliferierenden Zellen wurden bereits früher beschrieben, zum Beispiel in Phytohaemagglutinin-stimulierten T-Lymphozyten, in denen die Konzentration der Pyrimidine stärker als die der Purine anstieg. Dieser Befund unterstreicht die Wichtigkeit der Pyrimidinnukleotide für DNA-Replikation

und Membranbiosynthese im Rahmen der Zellproliferation. Dementsprechend ist das multifunktionale Protein CAD, das die ersten drei Enzyme der de-novo-Pyrimidinbiosynthese umfasst, in proliferierenden Zellen verstärkt exprimiert (Fairbanks *et al.*, 1995). Bei unserer Probe Nr. 22 (sekundäre AML, s. Tab. 3.5) waren die Purinkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle nur leicht erhöht. Dagegen waren die Pyrimidinkonzentrationen auf das zwei- bis dreifache der Norm erhöht, besonders bei den Cytidinen. Die de-novo-Synthese von Purinen scheint in diesen malignen Zellen also nicht so stark aktiviert zu sein wie die de-novo-Synthese der Pyrimidine. Vermehrte Pyrimidinsynthese lässt sich auch in normalen Lymphozyten finden. Sie nutzen für ihren CTP-Bedarf die Wiederverwertungsreaktion über Cytidin. Andere normale Zellen, die nicht proliferieren, decken ihren gesamten Pyrimidinbedarf im allgemeinen über die Wiederverwertung, ohne ihre de-novo-Synthese zu aktivieren (Barankiewicz, J *et al.*, 1987). Bei MDS ist über den Bedarf an de-novo-Pyrimidinsynthese noch nichts bekannt.

Neben 8 AML-Proben untersuchten wir auch Zellen von 14 MDS-Patienten. Wie bei den leukämischen Zellen fiel auch bei MDS in einigen Fällen ein erhöhter Quotient aus den Summen der Uridin- und der Guanosinphosphate auf, z.B. bei der Probe Nr. 6 (Tab 3.5), die den MDS-Typ einer refraktären Anämie repräsentiert. Die Knochenmarkszellen wiesen einen komplexen Karyotyp auf, und die Patientin verstarb drei Monate nach Erstdiagnose des MDS an sekundärer AML. Bei gesunden Probanden wie auch bei MDS blieb der Uridin/Guanosin-Quotient im allgemeinen unter einem Wert von 1. Nur bei MDS vom Typ RAEB II war der Quotient in einigen Fällen größer als 1. Möglicherweise lässt sich eine Krankheitsprogression mit Blastenvermehrung und erhöhtem Risiko leukämischer Transformation auch anhand eines erhöhten Quotienten aus Uridin-und Guanosinphosphaten erkennen.

Weitere Nukleotidimbalancen wurden bei MDS oder AML nicht identifiziert. Dies könnte daran liegen, dass bei der Gewinnung mononukleärer Knochenmarkszellen durch Dichtegradientenzentrifugation ein substantieller Teil der pathologischen Zellen verloren geht, nämlich jene, die besonders stark durch zelluläre Dysfunktion beeinträchtigt sind, deshalb apoptotisch schrumpfen und somit ins Pellet wandern (Shetty *et al.*, 2000). Dieses Problem ließe sich nur dadurch umgehen, dass man die Zellen nicht mittels Zentrifugation, sondern durch "high-speed sorting" mit einem FACS-Gerät gewinnt.

Es ist aber auch möglich, dass die Knochenmarkszellen ihren Nukleotidbedarf ausreichend über den *salvage pathway* decken können, auch wenn der pathologische Klon unter gestörter de-novo-Pyrimidinsynthese leidet. Diese Möglichkeit ist insbesondere deshalb in Betracht zu ziehen, da die Beeinträchtigung der de-novo-Pyrimidinsynthese durch mutationsbedingte

mitochondriale Atmungskettendefekte wahrscheinlich weniger drastisch ausfällt als die artifizielle Inhibition der Atmungskette in vitro durch Inhibitoren wie Rotenon oder Antimycin A. Dass der *salvage pathway* jedoch nicht immer ausreicht, zeigen aktivierte T-Lymphozyten, bei denen eine Inhibition der de-novo-Pyrimidinsynthese durch den DHODH-Inhibitor Leflunomid zu drastischem Absinken der Pyrimidinkonzentrationen und entsprechender Proliferationshemmung führt. Leflunomid wird deshalb erfolgreich in der Therapie der rheumatoiden Arthritis verwendet.

5 Literaturverzeichnis

Angermüller, S.; Löffler, M. Localization of dihydroorotate oxidase in myocardium and kidney cortex of the rat. *Histochemistry* **1995**, 103: 287-292.

Barankiewicz, J.; Cohen, A. Purine nucleotide metabolism in phytohemagglutinin-induced human T lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1987**, 258: 167-175.

Beuneu, C.; Auger, R.; Löffler, M.; Guissani, A.; Lemaire, G.; Leopoivre, M. Indirect inhibition of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase activity by nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine* **2000**, 23: 1206-1213.

Berger, G.; Hunault-Berger, M.; Rachieru, P.; Fontenay-Roupie, M.; Baranger, L.; Ifrah, N.; Zandecki, M. Increased apoptosis in mononucleated cells but not in CD34(+) cells in blastic forms of myelodysplastic syndromes. *Hematology Journal* **2001**, 2: 87-96.

Bossy-Wetzal, E.; Newmeyer, D.; Green, R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO Journal* **1998**, 17: 37-49.

Boulwood, J.; Fidler, C. Chromosomal deletions in myelodysplasia. *Leukemia and Lymphoma* **1995**, 17: 71-78.

Bøyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood and bone marrow. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **1968**, 21(Suppl. 97), 77-89.

Brown, W.M.; George, Jr.; Wilson, A. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1979**, 76: 1967-1971.

Buttgereit, F.; Brand, M. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochemical Journal* **1995**, 312: 163-167.

Eguchi, Y.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Research* **1997**, *57*: 1835-1840.

Fairbanks, L.D.; Bofill, M.; Ruckemann, K.; Simmonds, A. Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. Disproportionate expansion of pyrimidine pools and contrasting effects of de novo synthesis inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*: 29682-29689.

Gattermann, N. From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* **2000**, *24*: 141-151.

Gattermann, N.; Dadak, M.; Hofhaus, G.; Wulfert, M.; Berneburg, M.; Loeffler, M.; Simmonds, A. Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2004**, *23*: 1275-1279.

Green, D.R.; Reed, J.C. Review: Mitochondria and Apoptosis. *Science* **1998**, *281*: 1309-1312.

Greenberg, P.L. Apoptosis and its role in myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leukemia Research* **1998**, *22*: 1123-1136.

Hofhaus, G.; Attardi, G. Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product. *The EMBO Journal* **1993**, *12*: 3043-3048.

Hofhaus, G.; Attardi, G. Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Molecular and Cellular Biology* **1995**, *15*: 964-974.

Hofhaus, G.; Johns, D.; Hurko, O.; Attardi, G.; Chomyn, A. Respiration and growth defects in trans-mitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*: 13155-13161.

Jacobs, A. Primary acquired sideroblastic anemia. *British Journal of Hematology* **1986**, *64*: 415-418.

Joshi, B.; Li, L.; Taffe, B.G.; Zhu, Z.; Wahl, S.; Tian, H.; Ben-Josef, E.; Taylor, J.D.; Porter, A.T.; Tang, D.G. Apoptosis induction by a novel anti prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid) requires the mitochondrial respiratory chain. *Cancer Research* **1999**, 59: 4343-4355.

Katarzyna, R.; Lynette, D.; Fairbanks; Elizabeth, A.; Carrey; Catherine, M.; Hawrylowicz; David, F.; Richards; Kirschbaum; Simmonds, A. Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans. *The Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273: 21682-21691.

King, M.P.; Attardi, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **1989**, 246: 500-503.

Korte, D.; Haverkort, W.; Van Gennip, A.; Roos, D. Nucleotide profiles of normal human blood cells determined by high-performance liquid chromatography. *Analytic Biochemistry* **1985**, 147: 197-209.

Kunz, B.A.; Kohalmi, S.E.; Kunkel, T.A.; Mathews, C.K.; McIntosh, E.M.; Reidy, J.A. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factoring in the maintenance of genetic stability. *Mutation Research* **1994**, 318: 1-64.

Löffler, M.; Jöckel, J.; Schuster, G.; Becker, C. Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1997**, 174: 125-129.

Löffler u. Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie (7. Auflage)* **2003**, S. 639-647.

Lynette, D.; Fairbanks; Bofill, M.; Ruckemann, K.; Simmonds, A. Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. *The Journal of Biological Chemistry*, **1995**, 270: 29682-29689.

Martinou, J.C.; Green, D.R. Breaking the mitochondrial barrier. *Molecular Cell Biology* **2001**, *2*: 63-71.

Merchav, S.; Wagemaker, G.; Souza, L.M.; Tatarsky, I. Impaired response of myelodysplastic marrow progenitors to stimulation with recombinant haemopoietic growth factors. *Leukemia* **1991**, *5*: 340-346.

Mufti, G.J. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* **1992**, *16*: 35-41.

Newmeyer, D.D.; Farschon, D.M.; Reed, J.C. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts, inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* **1994**, *79*: 353-364.

Raza, A.; Gezer, S.; Mundle, S.; Gao, X.Z.; Alvi, S.; Borok, R.; Rifkin, S.; Iftikhar, A.; Shetty, V.; Paracharidou, A. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* **1995**, *86*: 268-76.

Richter, C.; Park, J.W.; Ames, B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **1988**, *85*: 6465-6467.

Rotig, A.; Colonna, M.; Bonnefont, J.P.; Blanche, S.; Fischer, A.; Saudubray, J.M.; Munnich. A mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* **1989**, *22*; 1(8643),902-3.

Shetty, V.; Hussaini, S.; Broady-Robinson; Allampallam, K.; Mundle, S.; Borok, R.; Broderick, E.; Mazzoran, L.; Zorat, F.; Raza, A. Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood* **2000**, *96*: 1388-1392.

Shin, M.G.; Kajigaya, S.; McCoy, J.P.; Jr; Levin, B.C.; Young, N.S. Marked mitochondrial DNA sequence heterogeneity in single CD34+ cell clones from normal adult bone marrow. *Blood* **2004**, *103*: 553-561.

Simmonds, H.A.; Duley, J.A.; Davies, P.M. Analysis of purines and pyrimidines in blood, urine, and other physiological fluids. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A Laboratory Manual* **1991**, 397-424.

Steube, K.G.; Teepe, D.; Meyer, C.; Zaborski, M.; Drexler, H.G. A model system in haematology and immunology: the human monocytic cell line Mono-Mac-1. *Leukemia Research* **1997**, 21: 327- 335.

Tang; Jin; Tian; Yamazaki; Hideya; Inoue; Takehiro; Koizumi; Masahiko; Yoshida; Ken; Ozeki; Shuji; Toshihiko. Mitochondrial DNA influences radiation sensitivity and induction of apoptosis in human fibroblasts. *Anticancer Research* **1999**, 19: 4959-4964.

Taylor, R.W.; Barron, M.J.; Borthwick, G.M.; Gospel, A.; Chinnery, P.F.; Samuels, D.C.; Taylor, G.A.; Plusa, S.M.; Needham, S.J.; Greaves, L.C.; Kirkwood, T.B.; Turnbull, D.M. Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* **2003**, 112: 1351-1360.

Van den Berg; Lenthe; Busch; de Korte; Kuilenburg; Van Gennip. The roles of uridine-cytidine kinase and CTP synthetase in the synthesis of CTP in malignant human T-lymphocytic cells. *Leukemia* **1994**, 8: 1375-1378.

Verschuur, A.C.; Van Gennip A.H.; Leen, R.; Muller, E.J.; Elzinga, L.; Voûte, P.A.; Van Kuilenburg. Cyclopentenyl cytosine inhibits cytidine triphosphate synthetase in paediatric acute non-lymphocytic leukaemia: a promising target for chemotherapy. *European Journal of Cancer* **2000**, 36: 627-635.

Wallace, D.C.; Ye, J.H. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase β subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Current Genetics* **1987**, 12: 81-90.

Wickramasinghe, S.N.; Hughes, M. Capacity of ringed sideroblasts to synthesize nucleic acids and protein in patients with primary acquired sideroblastic anaemia. *British Journal of Haematology* **1978**, 38: 345-52.

Willman, C. Biologic and genetic features of the myelodysplastic syndromes, in ASH **2000** Educational Book, American Society of Hematology, 110-117.

Winkler, J.K.; Suttle, D.P. Analysis of UMP synthase gene and mRNA structure in hereditary orotic aciduria fibroblasts. American Journal of Human Genetics **1988**, 43: 86-94.

Wulfert, W.; Küpper, A.; Tappich, C.; Bottomley, S.; Bowen, D.; Germing, U.; Haas, R.; Gattermann, N. Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes **2006** (eingereicht).

6. Anhang mit Originaldaten

Exp Extract	143-B-Zellen nach 0h, 6h und 24h 20 nM Antimycin A Inkubation								Nr. 1		Nr.22		Osteosarkomzellen über 0h, 6h, 24h ohne und mit Uridinzugabe						RBC RF on allo
	143BAnti 0h 50µl	143BAnti 0h 10µl	143BAnti 6h 50µl	143BAnti 6h 10ml	143BAnti 24h 30µl	143BAnti 24h 10µl	Remission 50µl	MM 150µl	MDS/AML 10µl	5µl	RHO 0h 25µl	RHO 0h 10µl	RHO 6h 25µl	RHO 6h 10µl	RHO 24h 25µl	RHO 24h 10µl			
ATP	7438	8028	3152	2600	1706	1918	646	460	1299	1435	1066	1068	1472	1706	1097	963	1614		
ADP	4122	5105	5988	6162	4753	4287	87	59	244	266	2392	2438	2865	3888	2732	2919	86		
AMP	2461	2868	7160	7668	7709	6112	9	2	77	84	3454	3713	3818	4694	3710	3956	1		
IMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
GTP	2547	2298	1178	1186	704	804	109	87	319	380	700	675	749	831	580	531	81		
GDP	1009	1119	1549	1553	1321	1174	27	19	89	98	966	988	1091	1306	918	956	16		
GMP	?	814	?	1635	1751	1519	?	?	24	32	?	963	?	1154	?	869	0		
GDPS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35		
UTP	2469	2302	760	649	132	229	84	92	503	599	868	850	395	388	84	7	0		
UDP	1595	1807	1470	1470	617	465	15	8	109	122	2146	2256	883	1081	128	119	0		
UMP	1176	1429	2134	2357	1297	1169	4	0	58	67	3701	3963	1361	1663	226	231	0		
UDPGlucose	5132	5791	4495	5152	2200	1840	41	31	100	158	2610	2850	1635	2063	337	369	99		
UDPGalactose	1864	2107	1822	1710	830	653	26	14	147	68	1061	1100	752	875	112	188	27		
UDPGAA	883	1007	777	794	377	279	5	2	8	7	650	733	566	775	246	231	2		
CTP	751	751	51	?	?	?	7	5	35	56	175	355	16	275	?	?	0		
CDP	323	333	230	?	?	?	?	?	?	?	415	418	192	?	?	?	0		
CMP	327	450	1429	1393	1172	958	10	?	122	160	1200	1388	675	956	315	244	0		
CDPC	57	?	?	33	0	0			18	25	239	219	145	156	0	0	26		
CDPE																	26		
NAD	2359	2776	2528	2664	2268	1951	16	17	55	61	1595	1681	1535	1919	1545	1675	50		
NADP	0	0	0	0	0	0	9	2	obs	5	obs	35	obs	47	31	29	54		
ADPR	182	210	590	604	395	307	?	?	0	0	387	425	378	79	414	450	0		
ADPRP	288	204	279	173	230	258	8	5	17	19	130	88	151	131	128	107	1		
OR	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	178		

Comment: All triphosphates and diphosphates badly broken down to m- much better in the 143b series at time 0

NAD very stable in all extracts, so changes in other nucleotides are due to the manipulations alone not degradation due to cell membrane rupture as before

Again no NADP in the 143 series. No GDPS either. No deoxynucleotides in any series

Orotidine not present in any of your extracts this time. This was confirmed by red cell nucleotide extract run on the same day from a renal failure patient on allopurinol.

(Allopurinol elevates red cell orotidine (normally <5) and UDP sugars - UDPglucose and UDPgalactose)

It is impossible to tell whether the peak I have called CMP is solely that or partly CDPE because they elute at the same place with the same retention time and spectrum in the first 4 minutes

GDPS = GDP sugar UDPGAA = UDP glucuronic acid ADPRP = ADP-ribose phosphate

?=obscured by small dirt peak - not large this time (if present at all) 0=not detected

N.C (I) Patient mit MDS (RA,5q)

R.P Patient mit MDS (RA) transformed into AML

S.C Patient mit MDS (RAEB I) transformed into AML

P.H Patient mit gesundem Knochenmark

Keratinocyten 24h mit Antimycin A und Rotenon behandelt											N.C(NI)		R.P		S.C(Sch)		P.H		143-B-Zellen 0h, 6h, 24h 100nM Rotenon Inkubation			
Exp	NHK1	NHK3	NHK6	NHK7	NHK8	NHK9	NHK10	NHK11	NHK12		MDS RA 5g-		MDS RA		MDS RA		Control gesund		143BRot 0	143BRot 6	143BRot 24h	RBCTxRF
Extract	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	25µl	25µl		50µl	80µl	25µl	50µl	5µl	25µl	125µl		50µl	50ml	50µl	6µl
nM	0 Anti	0,5 Anti	5 Anti	10 Anti	20 Anti	10 Rot	50 Rot	100 Rot	200 Rot		Nr. 9		Nr. 21		Nr. 20		Nr. 2					
ATP	10585	21549	12470	8207	1700	16529	8338	3151	1950		756	720	1585	1622	907	889	905		10759	3680	2446	1260
ADP	2703	5933	3901	9866	4328	8304	7071	4245	4206		104	109	184	210	260	161	164		5716	6387	4515	94
AMP	1695	3743	2264	10289	6489	8279	8564	6281	7669		53	24	62	61	119	74	69		2567	7042	6208	9
Σ	14983	31225	18635	28362	12517	33112	23973	13677	13825		913	853	1831	1893	1286	1124	1138		19042	17109	13169	
IMP	1660	3590	1034	2461	905	3014	2001	2082	1663		59	61	34	38	96	8	10		146	303	775	0
GTP	1941	3879	1156	2168	731	3160	2274	884	544		143	118	356	327	228	212	191		3551	1588	1096	25
GDP	655	1393	908	2344	1441	1716	1569	1016	983		39	33	32	44	68	31	42		1308	1714	1316	10
GMP	365	923	476	2619	2113	1877	1943	1462	1653		0	0	0	0	13	0	0		564	1613	2296	0
Σ	2961	6195	2540	7131	4285	6753	5786	3362	3180		182	151	388	371	309	243	233		5423	4915	4708	
GDPS	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	8
OMP/Nr	1062	1306	1261	686	510	1216	1088	933	902													
OMP	498	1306	862	760	320	1216	942	494	430		8	10	92	102	42	15	19		1483	1052	798	0
OR	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	3
UTP	1129	2203	1156	252	10	1294	596	150	29		117	120	490	471	300	183	140		3269	786	425	0
UDP	488	931	546	517	133	871	584	347	245		16	14	27	38	85	10	9		2071	1729	1066	0
UMP	309	410	228	0	0	0	0	0	0		34	0	15	18	87	0	0		1346	2390	0	0
Σ	1926	3544	1930	769	143	2165	1180	497	274		167	134	532	527	472	193	149		6686	4905	1491	
UDPGlu	969	1839	1523	1315	557	2309	1809	917	820		28	29	99	101	83	40	39		730	3713	2779	19
UDPGa	411	874	262	107	0	293	119	84	10		35	38	99	109	77	30	29		1160	540	328	3
UDPGA	429	769	365	241	84	486	274	260	125		7	7	10	7	8	0	2		650	876	494	0
Σ	1809	3482	2150	1663	641	3088	2202	1261	955		70	74	208	217	168	70	70		2540	2555	3601	
CTP	195	324	127	47	0	143	0	0	0		56	46	127	100	17	26	34		1263	407	240	0
CDP	86	153	29	56	31	114	54	35	24		0	0	0	9	0	0	2		434	325	161	0
CMP	?	?	?	?	?	?	?	?	?		?	?	?	?	?	?	?		?	?	?	0
Σ	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####	#####		#####	#####	#####	####	#WERT!	#####	#####		#WERT!	#WERT!	#WERT!	
CDPC	135	310	357	990	675	717	914	564	606		0	3	32	39	32	0	0		19	109	0	1
CDPE	290	993	520	1062	786	1122	895	893	1303		0	0	86	62	69	0	5		1064	1927	1331	18
NAD	1989	4241	2897	4698	2661	4204	3671	2246	2020		35	39	99	106	56	26	24		2991	2555	2132	58
NADP	0	0	0	0	0	0	0	0	2		0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	42
ADPR	178	156	231	449	302	499	499	262	303		0	5	0	6	17	2	3		238	454	175	7
ADPRP	123	117	62	141	81	167	167	73	69		13	13	18	16	16	12	11		252	231	170	0
Σ	2290	4514	3190	5288	3044	4870	4337	2581	2394		48	57	117	128	89	40	38		3481	3240	2477	
Comme	Orotidine again not present, but some OMP in all samples																					
	Some variation due to counting? I repeated N1, R, and P of the series of bone marrow cells because the peaks were small, but the duplicates were good																					
	Although the ? for CMP as before is there because it elutes with CDPC in the front and thus we cannot tell which is which I have called it CDPC mainly because of habit from the red cells which have no CTP etc																					
	Uridine and cytidine tides again severely depleted																					
	GDPS = GDP sugar		UDPGAA = UDP glucuronic acid		ADPRP = ADP ribose phosphate		OMP															
	OMP=orotidine monophosphate		0=not detected																			

Exp	2			3			4		
	Osteosarkomzelllinie = 143B-Zellen						Defekt im Komplex 1 = C4T-Zellen		
	Control	Anti 6h	Anti 24h	Control	Rot 6h	Rot 24h	Control	50nM Anti 24h	100nM Rot 24h
ATP	7733	2876	1812	10759	3680	2446	338	524	452
ADP	4614	6075	4520	5716	6387	4515	1183	1596	1231
AMP	2665	7414	6910	2567	7042	6208	2841	4393	3462
Σ	15011	16365	13242	19042	17109	13169	4362	6513	5145
IMP	0	0	0	146	303	775	215	332	244
GTP	2298	1186	754	3551	1588	1096	235	293	209
GDP	1119	1553	1247	1308	1714	1316	409	581	427
GMP	814	1635	1635	564	1613	1683	?	?	605
Σ	3894	3550	3636	5423	4915	4708			1241
UTP	2386	705	181	3269	786	425	116	145	122
UDP	1701	1470	541	2071	1729	1066	418	671	493
UMP	1303	2246	1233	1346	2390	1051	2674	4142	2219
Σ	5389	4420	1954	6686	4905	2542	3208	4958	2834
UDPGlu	5462	4824	2020	5459	3713	2779	1396	1993	1687
UDPGa	1986	1766	742	730	540	328	138	233	193
UDPGA	945	786	328	1160	876	494	338	504	410
Σ	8392	7375	3089	7349	5129	3601	1872	2730	2290
CTP	751	51	?	1602	407	240	0	0	21
CDP	328	230	?	434	325	161	24	135	42
CMP ?	589	1411	1065	1064	1927	1331	?	?	?
	1666	1552	1065	3100	2659	1732	32	131	52
Σ	0	0	0				?	?	?
NAD	2568	2596	2109	2991	2555	2132	883	1344	1075
NADP	0	0	0	0	0	0	12	17	12
ADPR	196	597	351	238	454	175	326	460	313
ADPRP	246	226	244	252	231	170	99	144	107
Σ	3010	3419	2704	3481	3240	2477	1320	2477	1507
OR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OMP	0	0	0	1483	1052	798	721	990	897

Mono-Mac-1-Zellen in nicht dialysiertem Medium kultiviert und mit Inhibitoren behandelt																									
	Mono-Mac-1-cells from 23.09.2003								Mono-Mac-1-cells					Mono-Mac-1-cells					RBX						
	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	infant					
	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	CDPCPT							
Treatment	Antimycin A				(nM)				Rotenone				(nM)				Control	Antimycin A			(nM)			Rotenone	f
	0	0	1	2	5	10	20	0	10	50	100	None	0	10	20	Control	100	age 4d							
ATP	1885	1988	2213	2531	1145	1710	1546	1712	1487	1631	1728	1509	2053	1554	1748	1938	1571	1113							
ADP	447	457	477	585	284	395	387	440	391	438	457	426	667	331	378	689	277	104							
AMP	110	83	103	41	79	100	108	126	94	134	142	114	226	88	105	258	58	13							
Σ	2441	2528	2793	3156	1508	2204	2041	2278	1972	2203	2327	2049	2946	1973	2231	2885	1906	2130							
IMP	31	34	34	52	32	65	91	61	56	60	64	40	14	94	55	13	85	6							
								0	0	0	0	0													
GTP	325	352	389	454	228	372	354	329	288	314	329	274	415	308	336	427	354	36							
GDP	77	81	84	106	54	80	83	83	77	86	88	80	132	70	76	141	62	11							
GMP	21	21	22	25	15	22	25	23	23	27	29	23	44	14	21	45	10	-							
Σ	423	454	495	585	297	0	463	435	388	427	446	377	591	392	433	613	426	47							
GDPS	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	12							
UTP	403	426	468	541	253	402	383	358	312	363	383	291	574	378	407	541	415	10							
UDP	114	114	132	157	66	96	104	96	92	103	104	96	194	77	83	180	65	3							
UMP	31	40	37	45	20	30	29	30	27	32	32	27	76	30	26	83	29	-							
Σ	548	580	637	742	339	529	516	485	430	498	519	414	844	485	516	804	509	13							
UDPGluc	166	170	190	210	91	135	134	143	125	134	146	125	269	139	148	247	135	85							
UDPGal	60	59	66	77	33	50	52	54	47	56	61	51	95	58	62	92	54	-							
UDPGAA	30	29	27	35	21	40	39	27	24	36	34	21	7	32	28	11	32	29							
CTP	79	83	98	113	51	87	94	70	63	79	86	57	92	97	96	88	114	8							
CDP	9	9	8	11	8	11	11	8	8	10	13	8	27	6	10	26	5	-							
CMP	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?							
CDPC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	181	208	226	181	234	80							
CDPE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	108	50	53	102	57	43							
dCDPE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31							
NAD	172	186	173	207	100	164	146	148	131	146	164	130	270	202	220	264	211	74							
NADP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48							
ADPR	59	55	64	77	40	58	73	65	61	75	74	62	80	57	65	88	44	2							
ADPRP	30	34	38	44	19	30	31	33	31	33	32	27	56	38	42	48	38	0							
OR	3	?	?	?	1	?	?	2	?	1	1	?	2	0	0	3	0	3							
Code	? = may be there but obscured								0 = not obscured and nothing there					CDPCPT = neonate in kindred with ? CDPcholine phosphotransferase deficiency (often mistaken for Py5NT- because of the CDPC's with high 280 absorbance)											
	GDPS = GDP sugar				UDPGAA = UDP glucuronic acid				ADPRP = ADPribose phosphate																
	?=obscured by small dirt peak - not large								0=not detected																

Mono-Mac-1-Zellen (dNTP-Extraktion 29.11. und 01.12.2003)

In dialysiertem Serum kultivierte Zellen

Erste dNTP-Extraktion am 29.11.

No. 1 ohne Ethanol	Kontrolle	9,45 x 10 ⁶ Zellen
No. 2 mit Ethanol	0 nM Antimycin A	10,30 x 10 ⁶ Zellen
No. 3	5 nM Antimycin A	7,15 x 10 ⁶ Zellen
No. 4	10 nM Antimycin A	5,95 x 10 ⁶ Zellen
No. 5	20 nM Antimycin A	5,35 x 10 ⁶ Zellen
No. 6	40 nM Antimycin A	6,45 x 10 ⁶ Zellen
No. 7 mit Ethanol	0 nM Rotenon	7,75 x 10 ⁶ Zellen
No. 8	10 nM Rotenon	7,45 x 10 ⁶ Zellen
No. 9	50 nM Rotenon	5,90 x 10 ⁶ Zellen
No. 10	100 nM Rotenon	5,95 x 10 ⁶ Zellen
No. 11	200 nM Rotenon	5,30 x 10 ⁶ Zellen

Zweite dNTP-Extraktion am 1.12.

No. 401 ohne Ethanol	Kontrolle	0,43 x 10 ⁶ Zellen
No. 402 mit Ethanol	0 nM Antimycin A	0,86 x 10 ⁶ Zellen
No. 403	5 nM Antimycin A	4,40 x 10 ⁶ Zellen
No. 404	10 nM Antimycin A	4,43 x 10 ⁶ Zellen
No. 405	20 nM Antimycin A	3,64 x 10 ⁶ Zellen
No. 406	40 nM Antimycin A	3,39 x 10 ⁶ Zellen
No. 407 mit Ethanol	0 nM Rotenon	9,58 x 10 ⁶ Zellen
No. 408	10 nM Rotenon	6,18 x 10 ⁶ Zellen
No. 409	50 nM Rotenon	4,38 x 10 ⁶ Zellen
No. 410	100 nM Rotenon	3,56 x 10 ⁶ Zellen
No. 411	200 nM Rotenon	2,38 x 10 ⁶ Zellen

Knochenmarkzellen (MNC) von Patienten

S.G. 24.06.1950	Nr. 40 / 05.06.03	Kontrolle (Lymphoma-Staging ohne Nachweis einer Knochenmarkinfiltration)	1,8 Mio
K.H. 13.01.1927	Nr. 42 / 12.06.03	Kontrolle (Lymphoma-Staging ohne Nachweis einer Knochenmarkinfiltration)	2,0 Mio
N.D. 13.09.1938	Nr. 49 / 11.07.03	MDS (RA)	1,3 Mio
K.S. 18.07.1970	Nr. 39 / 04.06.03	MDS (RARS)	6,4 Mio
E.J. 23.08.1929	Nr. 45 / 16.06.03	AML-M2	1,32 Mio
F.H. 15.04.1927	Nr. 37 / 19.05.03	AML nach MDS(RA)	21,0 Mio

	Bone marrow cells (MNC) from patients							RBX
	S.G	K.H	N.D	K.S	E.J	F.H	infant	
no	3	4	8	12	24	23	CDPCPT	
	control	control	MDS	MDS	AML M2	AML	f	
	lymphoma		RA	RARS	MDS(RA)		age 4d	
ATP	1162	1194	1936	1674	1086	683	1113	
ADP	86	103	102	226	122	174	104	
AMP	16	30	6	102	66	107	13	
Σ	1264	1327	2044	2002	1274	964	2130	
IMP	32	-	28	80	-	47	6	
GTP	212	180	304	398	208	189	36	
GDP	24	24	42	64	30	50	11	
GMP	2	2	-	34	14	25	-	
Σ	238	206	346	496	252	264	47	
GDPS	?	?	?	?	?	?	12	
UTP	230	256	276	350	238	250	10	
UDP	14	18	-	56	?	?	3	
UMP	6	8	8	26	16	57	-	
Σ	250	250	284	432	244	307	13	
UDPGluc	124	124	152	194	152	97	85	
UDPGal	32	28	44	4	46	36	-	
UDPGAA	6	2	-	-	-	-	29	
CTP	48	62	74	74	74	29	8	
CDP	-	-	-	6	-	5	-	
CMP	?	?	?	?	?	-	?	
CDPC	0	0	0	0	0	86	80	
CDPE	0	0	0	0	0	?	43	
dCDPE	0	0	0	0	0		31	
NAD	26	42	10	96	76	72	74	
NADP	14	14	16	26	28	10	48	
ADPR	-	-	-	-	-	?	2	
ADPRP	20	8	12	32	-	17	0	
OR	?	?	8	?	?	18	3	
Code	0 = not obscured and nothing there							
	GDPS = GDI			UDPGAA = UDP glucuronic acid		ADPRP = ADP ribose phosphate		
	?=obscured by small dirt peak			0=not detected				
	CDPCPT = neonate in kindred with ? CDP choline phosphotransferase deficiency (often mistaken for Py5NT- because of the CDPC's with high 280 absorbance)							

Extraktionsergebnisse aus Knochenmarkproben von 6 Patienten mit MDS und 2 Patienten mit akuter Leukämie

	WB	KR	PR	WH	WN	PH	CK	KS		RBC
Exp	AML-M	MDS(RARS)	MDS(RAEB I)	MDS(RAEB II)	MDS(RA)	MDS(RA)	MDS(RA5q)	T-ALL		RF
Nr.	26	13	17	14	5	7	11	31		
ATP	1073	1411	1277	2351	2238	2014	1566	397		1302
ADP	150	150	104	254	253	309	285	286		105
AMP	22	13	15	27	6	10	12	257		5
Σ	1245	1574	1396	2632	2497	2333	1863	940		1412
dATP	0	0	0	0	0	0	0	4		0
dADP	0	0	0	0	0	0	0	5		0
ATP Fe	0	1,6	2,9	3,3	0	3	5	0		
IMP	14	86	10	27	0	255	28	37		13
GTP	238	316	297	535	381	406	309	84		186
GDP	32	43	32	61	55	70	68	58		26
GMP	4	2	3	7	0	0	0	50		1
Σ	274	361	332	603	436	476	377	192		213
dGTP	2	0	0	0	0	0	0	2		
dGDP	0	0	0	0	0	0	0	1		
GDPS	6	10	12	15	10	14	14	6		34
UTP	353	307	276	613	687	318	290	101		0
UDP	32	31	20	44	34	22	48	71		0
UMP	9	13	6	17	15	6	16	104		0
Σ	394	351	302	674	736	346	354	276		0
UDPS	120	148	103	287	276	161	157	52		17
UDPGA	3	7	5	9	0bs	3	12	1		2
Σ										19
CTP	69	76	54	164	144	91	95	12		0
CDP	7	43	0	17	4	0	3	5		0
CMP	?	?	?	?	?	?	?	?		0
dCTP	2	3	1	4	4	3	0	1		0
CDPC	0	0	0	0	16	0	0	27		3
CDPE	52	72	59	11	155	67	109	51		17

	BM	BM	BM	A.T.	B.B	M.H	P.H	B.H	S.G	L.F	
	Norm	MDS	AML	PV	MDS/AML	RAEB T	RAEB II	RAEB II	MDS RA	MDS RA5q	
	n=4	n=2	n=5	Nr.30	Nr.29	Nr.15	Nr.16	Nr.18	Nr. 6	Nr.10	
ATP	725	738	1370	1433	2752	1464	1212	1460	1088	827	
ADP	118	107	233	123	251	282	850	106	88	88	
AMP	39	39	81	25	39	137	988	21	35	23	
Σ	882	883	1683	1581	3042	1883	3050	1587	1211	938	
IMP	5	60	34	21	26	97	86	95	107	?	
GTP	150	131	322	297	761	272	176	306	209	142	
GDP	30	36	66	33	74	59	246	26	20	18	
GMP	0	0	14	6	16	24	159	5	8	9	
Σ	180	167	402	336	851	355	581	337	237	169	
UTP	125	119	473	271	706	277	212	222	163	154	
UDP	11	15	76	22	52	62	210	18	18	11	
UMP	1	17	49	7	29	65	557	11	0	0	
Σ	137	151	598	300	787	404	979	251	181	165	
UDPGlu	38	29	108	102	260	136	343	84	63	74	
UDPGal	25	37	100	49	120	51	104	41	37	41	
UDPGA	2	7	8	6	28	5	30	3	2	4	
ADPRP	9	13	17	14	198	9	23	11	7	6	
Σ	65	72	216	157	408	192	477	128	102	119	
CTP	18	51	67	64	170	60	61	56	46	42	
CDP	1	0	2	?	3	3	32	?	?	?	
CMP	4	0	100	27	9	148	368	36	30	10	
Σ	23	51	169		182	211	461				
CDPC	0	2	29	39	20	100	241	3	0	0	
NAD	21	37	75	53	351*	73	273	66	38	38	
NADP	1	0	1	7	29	18	20	12	10	3	
ADPR	3	3	5	?	?	?	?	?	?	?	
ADPRP	9	13	17	14	198	9	23	11	7	6	
Σ	34	53	98								
OR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OMP	18	5	52	26	95	54	172	21	17	28	

Danksagungen

Meine tiefe Dankbarkeit gilt Herrn Prof. Dr. med. Norbert Gattermann für seine enthusiastischen Diskussionen mit genialen metaphorischen Erklärungen, die stetige Geduld und das in mich gesetzte Vertrauen.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Götz Hofhaus am Biochemischen Institut der HHU und Frau Prof. Dr. Monika Löffler am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg für die freundlichen Diskussionen bei der Interpretation der Ergebnisse.

Zusätzlich möchte ich Frau Dr. Anne Simmonds am Purine Research Unit am Thomas Guy's Hospital in London für die gute Zusammenarbeit danken.

Ebenfalls freue ich mich über die nette Bereitschaft vom Herrn PD Dr. Wessalowski aus der Pädiatrischen Onkologie, Hämatologie und Immunologie an der HHU, als Korreferent bei der Begutachtung dieser Arbeit mitzuwirken.

Sehr herzlich bedanke ich mich beim Herrn Dr. rer.nat. Michael Wulfert und Frau Monika Pooten und den weiteren Kollegen und Kolleginnen des Mito-Labors für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Vollendung dieser Promotionsarbeit.

Hiermit betone ich meinen Dank für die seelische Unterstützung von Freunden, u.a. der Familie Cirak, Moezz Zrida und insbesondere meiner Freundin, Selma Bahcivan, die als angehende Sozialpädagogin stets geduldig und verständnisvoll beim ganzen Ablauf dieser Arbeit mitwirkte.

Meine innigste Dankbarkeit gebührt meinen Eltern für ihre Fürsorge, die fortwährenden ermutigenden Nachfragen und den festen Beistand bei der Durchführung der Dissertation und die Verwirklichung meines beruflichen Werdeganges.

Meinen letzten Dank möchte ich meiner Schwester, Selma, widmen, für Ihren wissenschaftlichen Rat und die Dialoge über diese Arbeit, ihre unermüdliche Motivationskraft bei den Experimenten und insbesondere an Wendepunkten des Lebens.

Lebenslauf

Name Mete Dadak
Anschrift Drosselstr. 15
42659 Solingen
Geburtsort und Geburtstag Bad Oeynhausen / 17.06.1977
Familienstand ledig

Ausbildung

Schule 1985 - 1988
Staedt. Grundschule Boeckerhof Solingen,
1988 - 1990
Theodor-Heuss-Schule Realschule Solingen,
1990 - 1997 mit Abitur
Gymnasium August-Dicke-Schule Solingen

Universität April 1998 Medizinstudium an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
23.03.2000 Physikum
28.08.2001 1.Staatsexamen
31.03.2003 2.Staatsexamen
11.11.2004 3.Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

01.02.2005 bis 31.01.2006
Assistenzarzt in der Neurochirurgischen Klinik
und Poliklinik der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt

Seit 01.03.06
Assistenzarzt in der Klinik für Radiologische
Diagnostik des Universitätsklinikums Aachen

Veränderungen zellulärer Nukleotidkonzentrationen nach in-vitro-Blockierung der mitochondrialen Atmungskette

Mete Dadak

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind erworbene klonale Knochenmarkerkrankungen, die hauptsächlich im höheren Lebensalter auftreten. Sie sind durch ineffektive Hämatopoese und dementsprechend durch einen Mangel an reifen Blutzellen gekennzeichnet. Im Knochenmark finden sich dysplastische Veränderungen, zu denen auch eine pathologische Eisenüberladung der Mitochondrien in den Erythroblasten gehört. Dies deutet darauf hin, dass mitochondriale Defekte, ausgelöst durch altersabhängig auftretende Mutationen der mitochondrialen DNA, zum Phänotyp der myelodysplastischen Syndrome beitragen. Zu diesem Phänotyp gehören auch megaloblastäre Veränderungen, die auf einen Defekt der Nukleotidsynthese mit konsekutiver Störung der DNA-Replikation hinweisen. Die Ursache hierfür ist jedoch unklar, da bei MDS kein Folsäure- oder Vitamin-B12-Mangel vorliegt. Möglicherweise beruhen die megaloblastären Veränderungen ebenfalls auf einer mitochondrialen Störung. Ein wichtiges Enzym der de-novo-Pyrimidinsynthese, die Dihydroorotatdehydrogenase (DHODH), ist nämlich in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und überträgt Elektronen auf die mitochondriale Atmungskette. Dieser funktionelle Zusammenhang zwischen Pyrimidinbiosynthese und Atmungskette wurde bisher noch nie im Kontext eines Atmungskettendefektes untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb sowohl normale menschliche Keratinozyten als auch Zellen einer Osteosarkomzelllinie in vitro mit Inhibitoren der Atmungskette, nämlich Rotenon und Antimycin A, behandelt. Anschließend wurden die Nukleotide extrahiert, um deren Konzentration durch HPLC zu messen. Dabei zeigte sich, dass der Antimycin-Block im Komplex III der Atmungskette tatsächlich eine dosisabhängige Absenkung der Pyrimidinkonzentrationen bewirkte. Auch Rotenon, welches die Atmungskette im Komplex I inhibiert, also proximal der Elektronenübertragung durch DHODH, beeinträchtigte die Pyrimidinsynthese. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Rotenon und Coenzym Q, so dass beide innerhalb der Mitochondrienmembran um die Interaktion mit DHODH konkurrieren könnten. Eine Auswirkung der Atmungsketteninhibition auf die Purinnukleotide war ebenfalls zu erkennen, aber nicht in Form einer verminderten Gesamtkonzentration, sondern in Form einer Umverteilung von energiereichen Triphosphaten zu Di- und Monophosphaten. Dies lässt sich durch beeinträchtigte ATP-Regeneration infolge der Atmungsketteninhibition erklären. Bei den Pyrimidinen war dieser Effekt weniger gut zu erkennen, da er durch die drastische Absenkung der Pyrimidin-Gesamtkonzentration überdeckt wurde. Nachdem der experimentelle Nachweis einer Pyrimidinsynthesestörung als Folge eines Atmungskettendefektes gelungen war, wurden Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS daraufhin untersucht, ob dort veränderte Nukleotidkonzentrationen vorliegen. Die Nukleotidextrakte aus Knochenmarkszellen von 14 Patienten mit MDS- und 8 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie ließen jedoch keine eindeutig verminderten Pyrimidinkonzentrationen erkennen. Dies könnte methodisch bedingt sein, da bei der Gewinnung mononukleärer Knochenmarkszellen durch Dichtegradientenzentrifugation die von einer Nukleotidsynthesestörung betroffenen Zellen möglicherweise durch Apoptose eine veränderte Dichte aufweisen und deshalb bei der Prozedur größtenteils verloren gehen. Außerdem ist zu bedenken, dass mtDNA-Mutationen wahrscheinlich einen schwächeren Effekt auf die Pyrimidinsynthese haben als eine experimentelle Blockade der Atmungskette in vitro. In vivo ist zusätzlich der sogenannte *salvage pathway* zu berücksichtigen, der eine Störung der de-novo-Synthese durch Verwertung von im Serum vorhandenen Basen und Nucleosiden teilweise kompensieren kann.