

Aus der Klinik für
Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

Sauerstoffverbrauch mononukleärer Knochenmarkzellen bei
Patienten mit myelodysplastischen Syndromen und bei
Kontrollen mit gesundem Knochenmark

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dominik Wulf
2017

Als Inauguraldisseration gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Referent: Prof. Dr. med. Nobert Gattermann
Koreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Gesine Kögler

Meinen Eltern in Liebe gewidmet

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)	8
1.1.1 Ringsideroblasten.....	10
1.2 Rolle der Mitochondrien in der MDS-Pathogenese	11
1.3 Biochemische Grundlagen	11
1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien	11
1.3.2 Die oxidative Phosphorylierung	14
1.3.3 Atmungskontrolle	17
1.4 Mitochondriale Dysfunktion	18
1.4.1 Mögliche Ursachen mitochondrialer Defekte bei Myelodysplasien.....	19
1.4.2 Sauerstoffverbrauch mononukleärer Zellen bei MDS-Patienten.....	20
1.4.3 Eisenüberladung bei MDS	20
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Patientenkollektiv	23
2.2 Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.3 Verwendete Puffer und Kits	26
2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.5 Dichte-Gradienten-Zentrifugation.....	27
2.5.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmark	27
2.6 Zellzählung unter dem Mikroskop	28
2.7 Automatische Zellzählung.....	29
2.8 Probentransport	30
2.9 Der Oxygraph-2K.....	31
2.10 SUIT-Protokoll (Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll)	32
2.10.1 Verwendete Substrate und Inhibitoren der Atmungskettenkomplexe	33
2.11 Vorbereitung des Oxygraph-2K für die Messung	34

2.12	Ablauf der Messung	35
2.13	Proteinbestimmung nach Lowry	37
2.14	Auswertung und Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Zellzahl und Proteingehalt.....	38
3.1.1	Sauerstofffluss bezogen auf die Zellzahl	39
3.1.2	Mittelwerte des Sauerstoffflusses bezogen auf die Zellzahl.....	41
3.1.3	Sauerstofffluss bezogen auf den Proteingehalt.....	42
3.1.4	Mittelwerte des Sauerstoffflusses bezogen auf den Proteingehalt.....	45
3.2	Parameter der respiratorischen Kontrolle.....	46
4	Diskussion	49
5	Zusammenfassung.....	59
	Literaturverzeichnis.....	61

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AFP	Apoptose-induzierender Faktor
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cytochrom c-Oxidase
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
ETS	Elektronen-Transport-System
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FeS	Eisen-Schwefel- <i>Cluster</i>
FMN	Flavin Mononukleotid
$\Delta G^{0'}$	freie Standardreaktionsenthalpie
$j_{\sim P}$	<i>Oxphos Coupling Efficiency</i>
$j_{\sim R}$	<i>Routine Coupling Efficiency</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MgCl	Magnesiumchlorid
MNC	mononukleäre Zellen
mtDNA	mitochondriale DNA
mtPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
RCR	<i>Respiratory Control Ratio</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (deutsch: Ribonukleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (deutsch: reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> (deutsch: ribosomale Ribonukleinsäure)
SUIT-Protokoll	<i>substrate-uncoupler-inhibitor-titration-protocol</i>

TMPD	Tetramethylphenylendiamin
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> (deutsch: transfer-Ribonukleinsäure)
TTFB	4,5,6,7-Tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazol
UCP4	<i>uncoupling protein 4</i>

1 Einleitung

1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Die myelodysplastischen Syndrome sind eine heterogene Gruppe von erworbenen klonalen Stammzellerkrankungen des Knochenmarks (Janssen JW, *et al.* 1989, Walter MJ, *et al.* 2013). Der pathologische Klon entstammt einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle und zeigt eine abnorme Proliferation mit Differenzierungs- und Reifungsdefekten. Die klonalen Veränderungen scheinen schon sehr früh in der MDS Pathogenese stattzufinden und bei einigen Patienten können zytogenetische Veränderungen bereits vor morphologischen oder klinischen Zeichen auftreten (Traweek ST, *et al.* 1994; Mecucci C 1998). Genetische Veränderungen kommen bei fast allen Patienten mit MDS vor. Die häufigsten Mutationen betreffen die Gene TET2, SF3B1, ASXL1, SRSF2, DNMT3A und RUNX1 (Papaemmanuil E, *et al.* 2013). Darüber hinaus sind viele weitere Genmutationen bei MDS beschrieben worden. Das RNA-*Splicing* ist hierbei der am häufigsten betroffene biologische Prozess. Es sind aber auch Gene betroffen, die mit der DNA-Methylierung, der Transkription, der RAS-Signaltransduktion, der DNA-Reparatur oder der Chromatin-Modifikation assoziiert sind (Papaemmanuil E, *et al.* 2013, Haferlach T, *et al.* 2014 (b)).

Zytomorphologisch zeigen die myelodysplastischen Syndrome in einer oder mehreren myeloischen Differenzierungslinien dysplastische Veränderungen (Koeffler HP, Golde DW 1980). Zahlreiche Arbeitsgruppen fanden eine gesteigerte Apoptoserate von Knochenmarkszellen bei MDS (Raza A, *et al.* 1995; Greenberg PL 1998; Tehranchi R, *et al.* 2005). Die eingeschränkte Produktion funktionstüchtiger Blutzellen führt zu den klinischen Symptomen myelodysplastischer Syndrome, welche sich durch Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie auszeichnen können. Daher leiden die Patienten neben Schwäche und Abgeschlagenheit auch

unter Infektanfälligkeit und Blutungsneigung (Wiernik PH, *et al.* 2003). Die pathologischen MDS-Zellen haben eine verstärkte Neigung zur leukämischen Transformation mit Entwicklung einer AML (Layton DM, Mufti GJ 1986).

Die Todesursache bei Patienten mit MDS ist in 83,4% auf die zugrundeliegende MDS-Erkrankung zurückzuführen. 46,6% der MDS-Patienten sterben an den Folgen einer AML, 27% an den Folgen einer Infektion und 9,8% an Blutungskomplikationen. In 16,6% der Todesfälle ist die Ursache nicht direkt auf die MDS-Erkrankung zurückzuführen (Nachtkamp K, *et al.* 2016).

Es gibt verschiedene Ansätze, myelodysplastische Syndrome zu klassifizieren. Die von der *French-American-British Cooperative Group* 1982 vorgeschlagene FAB-Klassifikation ist die erste Klassifikation, die verschiedene MDS-Typen unterscheidet (siehe Tabelle 1.1). Die WHO-Klassifikation von 2008 ist eine Weiterentwicklung der Klassifizierung, die myelodysplastischen Syndrome in Korrelation zur Prognose der Patienten einzuteilen (siehe Tabelle 1.2).

FAB-Klassifikation	Blutbildkriterien	Knochenmarkkriterien
refraktäre Anämie	≤ 1 % Blasten	< 5 % Blasten
refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	≤ 1 % Blasten	< 5 % Blasten ≥ 15 % Ringsideroblasten
refraktäre Zytopenie mit Blastenvermehrung (RAEB)	< 5 % Blasten	5 – 20 % Blasten oder Auer-Stäbchen
refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung in Transformation (RAEB-T)	≥ 5 % Blasten	20 – 30 % Blasten
chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)	< 5 % Blasten > 1*10 ⁹ /l Monozyten	0 – 20 % Blasten

Tabelle 1.1 FAB-Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome von Bennett JM, *et al.* 1982 (aus Myelodysplastische Syndrome von A bis Z, 3. Auflage 2014, Haferlach T (a))

WHO-Klassifikation 2008	Häufigkeit*	Blutbildkriterien	Knochenmarkskriterien
refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD) • refraktäre Anämie (RA) • refraktäre Neutropenie (RN) • refraktäre Thrombozytopenie (RT)	9%	Uni- oder Bizytopenie, keine oder nur seltene Blasten (<1%)	unilineäre Dysplasie: ≥ 10% der Zellen einer myeloischen Linie, < 5% Blasten, < 15% Ringsideroblasten
refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	7%	Anämie, keine Blasten	nur erythropoetische Dysplasie, < 5% Blasten, ≥ 15% Ringsideroblasten
refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)	47%	Zytopenie(n), keine oder nur seltene Blasten (< 1%), keine Auer-Stäbchen, < 1*10 ⁹ /l Monozyten	Dysplasie in ≥ 10% der Zellen in ≥ 2 myeloischen Zelllinien (neutrophile und/oder erythroide Vorläufer und/oder Megakaryozyten), < 5% Blasten, keine Auer-Stäbchen, ± 15% Ringsideroblasten
refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung (RAEB-1)	15%	Zytopenie(n), < 5% Blasten, keine Auer-Stäbchen, < 1*10 ⁹ /l Monozyten	uni- oder multilineäre Dysplasie, 5-9% Blasten, keine Auer-Stäbchen,
refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung (RAEB-2)	18%	Zytopenie(n), 5-19% Blasten, ± Auer-Stäbchen, < 1*10 ⁹ /l Monozyten	uni- oder multilineäre Dysplasie, 10-19% Blasten, ± Auer-Stäbchen
myelodysplastisches Syndrom, unklassifiziert (MDS-U)	selten	Zytopenien, < 1% Blasten	eindeutige Dysplasie, aber in < 10% der Zellen, in einer oder mehreren myeloischen Linien, sofern von zytogenetischen Veränderungen begleitet, die einen Verdacht auf MDS begründen; < 5% Blasten
MDS mit isolierter del(5q) (MDS5q-)	4%	Anämie, Thrombozyten normal oder erhöht, keine oder nur seltene Blasten (< 1%)	quantitativ normale oder vermehrte Megakaryozyten mit hypobulbierten Kernen, isolierte zytogenetische Anomalie del(5q), keine Auer-Stäbchen

Tabelle 1.2 WHO-Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome von 2008 nach Brunning RD, *et al.* 2008 (aus Myelodysplastische Syndrome von A bis Z, 3. Auflage 2014, Haferlach T (a))

* Düsseldorfer MDS Register (Gerding U, *et al.* 2000)

1.1.1 Ringsideroblasten

Ringsideroblasten sind Erythroblasten, bei denen sich Eisen in den Mitochondrien anreichert. In der Berliner-Blau-Färbung wird dieses Eisen als Granula sichtbar, die sich perinukleär ringförmig anreichern (Cazzola M, Invernizzi R 2011).

„The International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndromes“ definiert Ringsideroblasten als Erythroblasten in denen mindestens fünf siderotische Granula wenigstens ein Drittel des Zellkerns umfassen (Mufti GJ, *et al.* 2008).

1.2 Rolle der Mitochondrien in der MDS-Pathogenese

Mitochondrien werden schon seit einigen Jahren verdächtigt, in der Pathophysiologie des MDS eine Rolle zu spielen. Hierbei konnte noch nicht geklärt werden, ob primäre Veränderungen der Mitochondrien zur MDS-Pathogenese beitragen oder ob Mitochondrien sekundär an der gesteigerten apoptotischen Aktivität von Knochenmarkszellen bei MDS beteiligt sind (Gattermann N 2008).

1.3 Biochemische Grundlagen

1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind fadenförmige Zellorganellen. Sie sind 0,2 - 0,5 µm breit und ihre Länge kann bis zu 10 µm betragen. Man findet sie in allen eukaryotischen Zellen, außer den Erythrozyten, in unterschiedlicher Anzahl (Benninghoff A, Drenckhahn D 2008). Eine ihrer Hauptfunktionen ist die Versorgung der Zelle mit chemischer Energie für die notwendige Biosynthese und Bewegungsaktivität (Fawcett DW 1981).

Die Zellmembran der Mitochondrien besteht aus zwei Lipiddoppelschichten. Zwischen diesen Lipiddoppelschichten befindet sich der intermembranäre Spalt. In diesem intermembranären Spalt befinden sich die Proteine Cytochrom c (Elektronenüberträger) und die Adenylat-Kinase (führt der oxidativen Phosphorylierung AMP zu $[AMP + ATP \Leftrightarrow 2 ADP]$), die für die Energiegewinnung wichtig sind (Löffler G, Petrides PE 2003). Die innere Membran umschließt den Matrixraum. Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die innere Membran zu sogenannten Cristae gefaltet,

hierdurch wird ihre Oberfläche um ein Vielfaches vergrößert (Sjöstrand FS 1953, Palade GE 1956).

Das dominierende Protein der äußeren Membran ist das Porin. Die Porine bilden spannungsabhängige Anionenkanäle, welche in geöffnetem Zustand für organische und anorganische Anionen und Wasser, aber auch für größere Moleküle wie ATP, NAD oder Pyruvat durchlässig sind. Porine werden durch das mitochondriale Membranpotential der äußeren Membran reguliert (Mannella CA, Colombini M 1984).

Im Vergleich zur äußeren Membran besitzt die innere Membran einen höheren Proteinanteil. Cholesterin fehlt der inneren Membran fast vollständig. Sie besitzt einen hohen Anteil an Cardiolipin, wodurch ihre Permeabilität, insbesondere für Protonen (H^+ -Ionen) vermindert wird. Nahezu alle Moleküle und Ionen benötigen spezielle Transportmechanismen, um sie zu passieren (Karp G 2013). An Kontaktpunkten der inneren und äußeren mitochondrialen Membran bilden der spannungsabhängige Anionenkanal und der ADP/ATP-Transporter einen gemeinsamen Komplex, die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore (mtPTP). Das mitochondriale Protein Bcl2 stabilisiert mtPTP und wirkt somit antiapoptotisch. Apoptosestimulatoren wie das Bax-Protein führen zu einer Öffnung des mtPTP. Dies führt zu einem Austritt von Cytochrom c und AFP (Apoptose-induzierender Faktor) in das Zytoplasma. Dort aktivieren sie Caspasen, die den Zelltod einleiten (Benninghoff A, Drenckhahn D 2008).

An der inneren Membran befindet sich die Atmungskette mit den Komplexen I-IV. Zur Atmungskette zählen auch die Proteine Ubichinon und Cytochrom c, die als Elektronenüberträger fungieren. Die Komplexe der Atmungskette liegen teilweise transmembranär oder peripher. Ebenfalls an der inneren mitochondrialen Membran befindet sich der F_1F_0 -Komplex, an dem die ATP-Synthese stattfindet.

Neben der Energiegewinnung sind Mitochondrien an weiteren wichtigen Stoffwechselwegen beteiligt. So enthält die mitochondriale Matrix Enzyme des Citratzyklus, des Harnstoffzyklus, der β -Oxidation der Fettsäuren, der

Hämbiosynthese, des Steroidstoffwechsels, des Abbaus vieler Aminosäuren und der Proteinbiosynthese (Löffler G, Petrides PE 2003). Die mitochondriale Matrix enthält außerdem Kalziumspeicher in Form von Kalziumphosphat und eine ringförmige DNA. Die menschliche mitochondriale DNA enthält 16 569 Basenpaare. Diese codieren für 13 Proteine, 22 tRNAs und zwei rRNAs (Anderson S, *et al.* 1981). Bei sämtlichen mitochondrial kodierten Proteinen handelt es sich um Untereinheiten der Enzymkomplexe I, III, IV und V der Atmungskette.

1.3.2 Die oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien ist der Hauptlieferant der Zelle für das als universelle Energiequelle eingesetzte ATP. Die Energie für diesen Vorgang stammt aus der Verbrennung von Nährstoffen (Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten) zu CO₂ und Wasser. Bei der Verbrennung handelt es sich um einen enzymatischen Prozess, bei dem den Nährstoffen durch Dehydrogenasen Wasserstoff entzogen wird. Der Wasserstoff wird als sogenanntes Reduktionsäquivalent in Form von NADH und FADH₂ zwischengespeichert. Dieser Prozess wird durch den Citratzyklus und die Glykolyse sichergestellt, die somit wichtige Bindeglieder zwischen Substratabbau und oxidativer Phosphorylierung darstellen. Für den Transport von zytosolischem NADH, z.B. aus der Glykolyse, in die mitochondriale Matrix dienen verschiedene Transportproteine, die auch als mitochondriale *Carrier* bezeichnet werden (Krebs HA, 1967).

Bei den Reaktionen der Atmungskette wird der an NADH und FADH₂ gebundene Wasserstoff schrittweise auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die Reaktion entspricht im Prinzip der Knallgasreaktion: $\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$; $\Delta G_0' = -235 \text{ kJ/mol}$ (Löffler G, Petrides PE 2003).

Die Oxidation von Substratwasserstoff und die Kondensation von ADP und anorganischem Phosphat sind zwei chemisch unterschiedliche Reaktionen. Die gespeicherte Energie in den Reduktionsäquivalenten muss folglich in eine völlig verschiedene Energieform umgewandelt werden. Dieses Problem lösen die Mitochondrien, indem die Energie als elektrochemischer Protonengradient über ihre innere Membran zwischengespeichert wird. Dieser Gradient wird durch die Atmungskettenkomplexe gebildet, welche die Elektronen der Reduktionsäquivalente schrittweise bis auf den Sauerstoff übertragen, und dann zur ATP-Synthese nutzen (Abbildung 1.1). Dieses als chemiosmotische Hypothese bezeichnete Model wurde erstmals 1961 durch Peter Mitchell beschrieben (Mitchell P 1961).

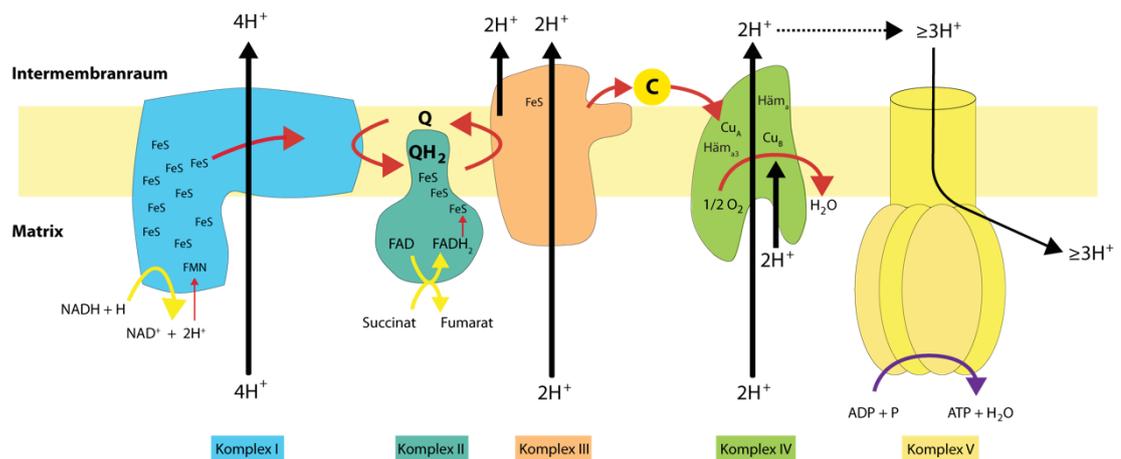


Abbildung 1.1 zeigt den Multiproteinkomplex der Atmungskette und der ATP-Synthase. Einschleusung der Elektronen über NADH und FADH₂ und schrittweises Zuführen der Elektronen über Ubichinon (Q) und Cytochrom c (C) auf Sauerstoff (O₂) im Komplex IV. FeS = Eisen-Schwefel-Cluster; FMN = Flavin Mononukleotid (Löffler G, Petrides PE 2003, modifiziert)

Der Komplex I (Ubichinon-Oxidoreduktase) besteht aus 45 verschiedenen Proteinuntereinheiten. Sieben dieser Untereinheiten werden durch das mitochondriale Genom codiert. Der Komplex I oxidiert das vor allem im Citratzyklus, in der β -Oxidation und durch die Pyruvatdehydrogenase gebildete NADH. Das Flavin-Mononukleotid (FMN) ist der primäre Akzeptor der Elektronen. Über neun Eisen-Schwefel-Cluster (FeS) werden die Elektronen weiter an die Bindungsstelle des Ubichinon (Q) geführt (Carroll J, *et al.* 2006). Bei der Oxidation eines NADH-Molekül werden insgesamt vier Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum gepumpt.

Der Komplex II (Ubichinon-Oxidoreductase) besteht aus zwei hydrophoben Untereinheiten, die den Komplex in der inneren mitochondrialen Membran verankern und zwei hydrophilen Untereinheiten: dem FAD-bindenden Protein (Flavoprotein) und einem Eisen-Schwefel-Cluster. Das Flavoprotein entspricht der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus. Das dort gebildete FADH₂ überträgt seine Elektronen im selben Enzymkomplex über Eisen-Schwefel-Cluster weiter auf Ubichinon. Dabei werden keine Protonen gepumpt (Sun F, *et al.* 2005).

Der Komplex III (Cytochrom c-Oxidoreduktase) besteht aus 11 Untereinheiten. Es ist

der einzige Komplex, der das durch Komplex I und II reduzierte Ubichinon reoxidieren kann. Dies geschieht durch Übertragung der Elektronen über das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein und Häm-Komplexe auf Cytochrom c. Da der Redoxwechsel des Ubichinons mit einer Protonenabgabe bzw. Protonenaufnahme gekoppelt ist, können so in der Summe Protonen über die Membran transportiert werden, ohne dass sie im eigentlichen Sinne „gepumpt“ werden. Pro oxidiertem Ubihydrochinon werden zwei Protonen in den Intermembranraum transportiert (Crofts AR, Berry EA 1998; Cecchini G 2003).

Der Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) besteht aus 13 Untereinheiten, davon werden zwei durch mitochondriale DNA kodiert. Der Komplex besitzt vier Metall-Komplexe (Cu_A , Cu_B , Häm_a und Häm_{a3}), über die Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff übertragen werden (Cecchini G 2003). Es werden je Sauerstoffatom insgesamt vier Protonen über die Membran gepumpt.

Angetrieben durch schrittweise Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff transportieren die Komplexe I, III und IV insgesamt zehn Protonen je oxidiertem NADH über die innere Mitochondrienmembran. Da bei der Einschleusung von Elektronen über den Komplex II der Komplex I umgangen wird, tragen in diesem Fall nur die Komplexe III und IV mit 6 Protonen zur Ausbildung des Protonengradienten bei.

Der Komplex V ($\text{F}_1\text{-F}_0\text{-ATP-Synthase}$) nutzt den Protonengradienten zur ATP-Synthese. Er besteht aus 16 verschiedenen Untereinheiten, wobei zwei mitochondrial codiert werden. Durch den F_0 -Teil fließen die Protonen, der F_1 -Teil enthält die Bindungsstellen für das ADP + Phosphat beziehungsweise das ATP. Der Protonenfluss aus dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix bewirkt eine Drehbewegung der ATP-Synthase, die dann über eine Konformationsänderung die ATP-Bildung ermöglicht (Lutter R, *et al.* 1993; Boyer PD 1997).

1.3.3 Atmungskontrolle

Mitochondrien können nur dann schnell Substrat oxidieren, wenn ihnen ADP und anorganisches Phosphat zur Verfügung stehen. Diese Kopplung von Substratoxidation und ATP-Bildung wird auch als Atmungskontrolle bezeichnet. In Anwesenheit von Sauerstoff und Succinat als Substrat erhöht sich die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs erst nach Zugabe von ADP und geht wieder zurück, wenn das zugesetzte ADP komplett zu ATP phosphoryliert worden ist. 1955 haben Chance und Williams fünf Fließgleichgewichtszustände definiert, wobei die Atmungsgeschwindigkeit durch verschiedene Effektoren kontrolliert werden kann (Chance B, Williams GR 1955). Eine Besonderheit stellen Entkoppler dar, die den passiven Rückstrom von Protonen ermöglichen und so das elektrochemische Potential aufheben. In diesem Zustand hat ATP keinen Einfluss auf die Atmungsgeschwindigkeit (Löffler G, Petrides PE 2003). In Tabelle 1.3 sind die verschiedenen Zustände aufgelistet.

Zustand	ADP Menge	Substrat Menge	Atemrate	Atemrate begrenzt durch	Kopplungszustand (<i>coupling state</i>)
1	↓	↓	langsam	ADP und Substrat	<i>ROUTINE</i>
2	↑	~ 0	langsam	Substrat	<i>ROX</i>
3	↑	↑	schnell	Atmungskette	<i>OXPHOS</i>
4	↓	↑	langsam	ADP	<i>LEAK</i>
5	↑	↑	~ 0	O ₂	anoxisch
entkoppelt	-	↑	schnell	Elektronentransport	<i>ETS</i>

Tabelle 1.3 Fließgleichgewichtszustände der Atmungskette nach Chance und Williams (1955), modifiziert nach Gnaiger 2014.

Die rechte Spalte zeigt zusätzlich die in Laborversuchen künstlich erzeugten Kopplungszustände (sog. *coupling states*):

ROUTINE = Zellatmung von intakten Zellen mit endogenen Substraten ohne Stimulation durch Effektoren; *ROX* (*residual oxygen consumption*) = Zellatmung durch oxidative Nebenreaktionen, die nach Applikation von Inhibitoren des Elektronentransportsystems gemessen werden; *OXPHOS* (*oxidative phosphorylation*) = Oxidation von Substraten mit Elektronentransfer auf Sauerstoff und Kopplung an die Phosphorylierung von ADP zu ATP unter gesättigter Konzentration von ADP; *LEAK* = Zellatmung die nicht an die Phosphorylierung von ADP gekoppelt ist (z. B. intrinsische Entkopplung); *ETS* (*electron transfer system*) = Zellatmung nach vollständiger experimenteller Entkopplung des Elektronentransports von der Phosphorylierung von ADP zu ATP.

1.4 Mitochondriale Dysfunktion

Eine Hauptfunktion von Mitochondrien ist die Wiederherstellung von ATP durch die Atmungskette. 1980 wurden die ersten Hinweise für eine Fehlfunktion der Atmungskette bei Knochenmarkzellen von MDS-Patienten gefunden.

Bei Patienten mit primärer sideroblastischer Anämie, d.h. einer Anämie mit dem Auftreten von Ringsideroblasten, zeigten die Cytochrom c-Oxidase und die Oligomycin-sensitive ATPase, beides Enzyme der Atmungskette, eine reduzierte Aktivität im Vergleich mit Kontrollen, wobei die Citratsynthase, ein Enzym der mitochondrialen Matrix, keine Beeinträchtigung aufwies (Aoki Y 1980).

Später konnte gezeigt werden, dass Erythroblasten von Patienten mit RARS ein vermindertes mitochondriales Membranpotential aufweisen (Matthes TW, *et al.* 2000). Es konnte jedoch kein biochemischer Beweis gefunden werden, dass die Cytochrom c-Oxidase in ihrer Funktion beeinträchtigt ist (Matthes T, *et al.* 2006).

MDS-Zellen reagieren in der Zellkultur sensitiv auf Änderungen der Sauerstoffkonzentration. Steigt die Sauerstoffkonzentration über 3% an, reifen myeloische Progenitorzellen nicht effizient heran und gehen durch Apoptose verloren. Dies könnte bedeuten, dass Sauerstoff die Apoptose von hämatopoetischen Vorläuferzellen bei MDS durch oxidativen Stress begünstigt (Thompson JE, *et al.* 2007).

Ein primärer Defekt der mitochondrialen Atmungskette, welcher zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt, könnte die oben genannten Beobachtungen erklären. Indikatoren für oxidativen Stress wurden im Plasma (Fracchiolla NS, *et al.* 2003), in peripheren Blutzellen (Ghoti H, *et al.* 2007) und in Knochenmarkzellen (Peddie CM, *et al.* 1997; Bowen D, *et al.* 2003) von Patienten mit MDS gefunden.

1.4.1 Mögliche Ursachen mitochondrialer Defekte bei Myelodysplasien

Mitochondriale Dysfunktion kann durch Mutationen in Genen entstehen, die mitochondriale Proteine kodieren. Ein solches Protein ist das Chaperon HSPA9B. Es wird nukleär kodiert und sein Verlust kann bei Zebrafischen MDS-ähnliche hämatologische Befunde hervorrufen (Craven SE, *et al.* 2005). Dies konnte durch Chen *et al.* bestätigt werden. Seine Arbeitsgruppe zeigte, dass die verminderte Expression von HSPA9B in menschlichen CD34⁺ Progenitorzellen zu abnormer Proliferation, vermehrter Apoptose und veränderter Differenzierung führt (Chen TH, *et al.* 2007).

Als exogene Ursache von mitochondrialer Dysfunktion wirkt beispielsweise Chloramphenicol. Dieses Antibiotikum inhibiert die mitochondriale Proteinbiosynthese durch Interaktion mit der großen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen und beeinflusst dadurch die Synthese von Proteinen der Atmungskette. Hohe Dosen von Chloramphenicol inhibieren Komplex I der Atmungskette (Freeman KB, Haldar D 1968) und führen bei längerer Anwendung zu ineffektiver Hämatopoese mit Knochenmarkdysplasie und in einigen Fällen zur Bildung von Ringsideroblasten (Bottomley SS 1998).

13 Protein-Untereinheiten der Atmungskette sind auf der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert. Deshalb können Mutationen der mtDNA die Energiegewinnung an der Atmungskette beeinflussen (Gattermann N 2000). Liegen in einer Zelle unterschiedliche Kopien der mtDNA vor, bezeichnet man dies als Heteroplasmie. Mutationsanalysen mitochondrialer DNA bei Patienten mit MDS zeigten bei 56% der Patienten heteroplasmische Mutationen. Das Spektrum der Mutationen ergab keinen Hinweis auf spezifische *hotspots* (Wulfert M, *et al.* 2008).

1.4.2 Sauerstoffverbrauch mononukleärer Zellen bei MDS-Patienten

Bowen und Peddie führten 2002 Messungen des Sauerstoffverbrauches von mononukleären Zellen bei Gesunden (drei Knochenmarkproben und zwei Proben aus peripherem Blut) und bei Patienten mit MDS (fünf Knochenmarkproben und zwei Proben aus peripherem Blut) mithilfe einer Clark-Elektrode durch. Hierbei zeigten die Knochenmarkzellen der MDS-Patienten einen signifikant geringeren Sauerstoffverbrauch als Knochenmarkzellen von gesunden Probanden. In Zellen des peripheren Blutes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden. Bowen und Peddie postulieren, dass mitochondriale Dysfunktion ein Mechanismus ist, der zu übermäßigem Absterben von Knochenmarkzellen bei MDS beiträgt (Bowen D, Peddie C 2002).

1.4.3 Eisenüberladung bei MDS

Ringsideroblasten sind eine häufige morphologische Veränderung bei MDS und dürften daher eng mit dem Pathomechanismus von Myelodysplasien verbunden sein. Eine plausible Erklärung für die mitochondriale Eisenüberladung sollte daher das Verständnis der Pathogenese von MDS befördern.

Ringsideroblasten werden laut FAB Klassifikation nicht nur bei RARS, sondern auch bei refraktärer Anämie (RA), refraktärer Anämie mit Blastenüberschuss (RAEB) und in manchen Fällen auch bei refraktärer Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation (RAEB-T) gefunden. Bei refraktären Anämien variiert die Anzahl von Erythroblasten mit Eisengranula (Ringsideroblasten) zwischen 1% und 90%, so dass es keine klare Abgrenzung zwischen sideroblastischen und nicht-sideroblastischen Fällen gibt (Jacobs A, Bowen DT 1992).

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von erythropoetischen Zellen bei refraktären Anämien und myelomonozytären Leukämien fanden Maldonado JE, *et al.* Eisenüberschuss in den Mitochondrien und pathologische Sideroblasten in allen

untersuchten Patienten, die als MDS klassifiziert waren. Dabei war die Anwesenheit von Eisen in Mitochondrien oft von degenerativen mitochondrialen Veränderungen wie Schwellung, Vakuolisierung, Rissen oder Abspaltung der Cristae und Bildung von *myelin figures* begleitet (Maldonado JE, *et al.* 1976).

Erythrozytäre Vorläuferzellen von Patienten mit Niedrig-Risiko-MDS zeigen Merkmale von Autophagozytose (Houwerzijl EJ, *et al.* 2007). Dieser Mechanismus kann Proteine im Zytoplasma und sogar ganze Organellen abbauen. Autophagozytose könnte bei MDS-Patienten verstärkt sein, um defekte und mit Eisen überladene Mitochondrien zu entfernen. Da der Abbau von Organellen Energie liefert, könnte Autophagozytose zusätzlich das Überleben von Erythroblasten bei reduzierter Verfügbarkeit von Nährstoffen unterstützen (Gattermann N 2008).

Bei einer Störung der mitochondrialen Atmungskette könnte auf folgende Weise eine mitochondriale Eisenüberladung entstehen:

Normalerweise wird der Sauerstoff, der in die Mitochondrien gelangt, zum größten Teil an der Atmungskette verbraucht. Bei gestörter Atmungskettenfunktion ist ein geringerer O₂-Verbrauch und somit eine erhöhte Sauerstoffkonzentration in der mitochondrialen Matrix zu erwarten. Dies kann zur Oxidation des in die Mitochondrien importierten Eisens führen.

Eisen gelangt in zweiwertiger Form (Fe²⁺) durch die innere Mitochondrienmembran und muss in zweiwertiger Form gehalten werden, um von der Ferrochelatase akzeptiert zu werden, die Fe²⁺ in Protoporphyrin IX einbaut, um Häm herzustellen (Porra RJ, Jones OT 1963).

Wenn ein Überschuss an O₂ in der Mitochondrienmatrix das importierte Fe²⁺ zu Fe³⁺ oxidiert, dann ist dieses dreiwertige („gerostete“) Eisen für die Hämsynthese unbrauchbar, da es von der Ferrochelatase nicht verwertet werden kann. Fe³⁺ akkumuliert deshalb in der Mitochondrienmatrix (Grasso JA, *et al.* 1980; Gattermann N 2008; Gattermann N 2016).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll dem Verdacht nachgegangen werden, dass mitochondriale Dysfunktion an der Pathogenese von MDS beteiligt ist. Durch Messungen des Sauerstoffverbrauches von Knochenmarkzellen bei MDS-Patienten und Kontrollpersonen sollen die Untersuchungen von Bowen und Peddie (siehe 1.4.3) in einem größeren Patientenkollektiv verifiziert werden. Die Messungen sollen die verschiedenen Fließgleichgewichtszustände der Atmungskette berücksichtigen, um die Befunde besser interpretieren zu können. Zusätzlich soll der Verbrauch von Sauerstoff nicht nur auf die Zellzahl, sondern auch auf den Proteingehalt der Proben bezogen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Sauerstoffverbrauch von mononukleären Zellen aus 22 Knochenmarkproben gemessen. Die Patienten wurden im Rahmen der üblichen klinischen Diagnostik am Beckenkamm punktiert und ein Teil des aspirierten Knochenmarks wurde für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Proben der Kontrollgruppe ohne Knochenmarkerkrankung stammten aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie (Universitätsklinikum Düsseldorf) von Patienten, die sich einer kardiovaskulären Operation mit Sternotomie unterziehen mussten. Intraoperativ konnte das Sternum vor der Sternotomie punktiert und Knochenmark aspiriert werden.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf stimmte dem Vorhaben als Teilprojekt der Anträge mit den Studiennummern 3008 (*Beobachtungsstudie von MDS-Patienten der Deutsch-Österreich-Schweizerischen MDS-Gruppe*) und 3082 (*Intraoperative Gewinnung von Knochenmarksproben aus dem Sternum*) zu. Vor der Probengewinnung erfolgte eine Aufklärung der Patienten durch den behandelnden Arzt und die Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Vier Patienten mit der Diagnose einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) konnten in die Kontrollgruppe aufgenommen werden, da sie zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion eine molekulargenetische Remission ($bcr-abl/G6PDH < 0,01\%$) aufwiesen. Eine Patientin mit kompletter zytologischer Remission ihrer akuten myeloischen Leukämie (AML) konnte ebenfalls in die Kontrollgruppe aufgenommen

werden.

Die Ergebnisse von vier Patienten mussten von der Auswertung ausgenommen werden, da sich die initiale Verdachtsdiagnose MDS nicht bestätigte. In Tabelle 2.1 sind alle Patienten aufgelistet, die in die Auswertung mit einbezogen wurden.

Probe	Gender	Alter	Diagnose	Einteilung	Besonderheiten
#3	♀	54	Kontrolle	AML in Remission	
#2	♀	31	Kontrolle	CML in Remission	
#13	♀	41	Kontrolle	CML in Remission	
#15	♀	62	Kontrolle	CML in Remission	
#18	♀	67	Kontrolle	CML in Remission	
#20	♂	68	Kontrolle	kardiochirurgische OP	
#21	♂	60	Kontrolle	kardiochirurgische OP	
#22	♂	68	Kontrolle	kardiochirurgische OP	
#23	♂	71	Kontrolle	kardiochirurgische OP	
#24	♀	56	Kontrolle	kardiochirurgische OP	
#4	♂	75	MDS	RCMD	sek. AML aus MDS nach 5-Azacytidin Therapie
#9	♀	59	MDS	RCMD	
#11	♀	73	MDS	RCMD	
#12	♀	72	MDS	CMML Typ 1	
#14	♂	74	MDS	RAEB I	mit reaktiven Veränderungen durch 5-Azacytidin-Toxizität
#16	♂	78	MDS	RAEB I	mit reaktiven Zellveränderungen
#19	♀	73	MDS	RAEB II	
#25	♂	68	MDS	RAEB I	

Tabelle 2.1 Alle Proben, die in die statistische Auswertung einbezogen wurden.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Im Folgenden werden alle Materialien aufgelistet, die bei den Untersuchungen verwendet worden sind:

Reinstwasser	Milli-Q [®] -Wasser (Merck)
Lymphoprep [®]	Axis-Shield
Magnesiumchlorid	Sigma
Malat	Sigma
Glutamat	Sigma
Digitonin	Serva
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma
Pyruvat	Sigma
TTFB	Sigma
Ascorbat	Sigma
TMPD	Sigma
Rotenon	Sigma
Succinat	Sigma
Kalilauge	Sigma

Ascorbat, TMPD, Pyruvat und Digitonin wurden für jede Messung neu angesetzt und auf Eis gelagert.

Um die Löslichkeit von Digitonin zu verbessern, wurde der Ansatz mit Hilfe eines Feuerzeuges erhitzt.

2.3 Verwendete Puffer und Kits

PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*)

PBS-Puffer ist eine isotonische Salzlösung, die 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM NaHPO x 2H₂O, 2 mM KHPO enthält.

Inkubationsmedium

110 mM Mannitol; 60 mM Tris; 60 mM KCl; 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄); 0,5 mM NaEDTA;

Der Ansatz wird mit Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.

Total Protein Kit

Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson´s Modifikation (Sigma)

Produkt Nummer: TP0300 und L 3540

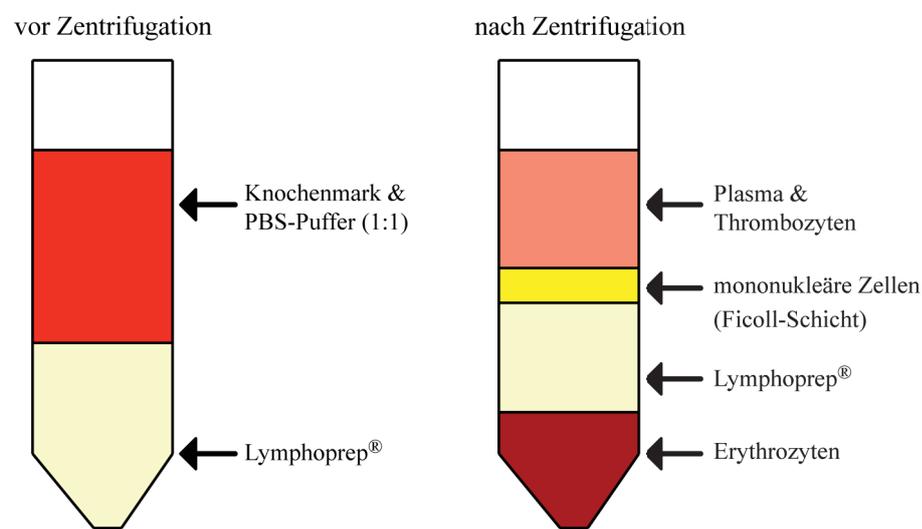
2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zentrifuge	Megafuge 1.0R Heraeus instruments
Universalindikator pH 0-14	Merck
Zellsieb 40µm	BD Biosciences, USA
Lichtmikroskop	Zeiss
Neubauer-Zählkammer	Brand
Oxygraph-2k	OROBOROS [®] INSTRUMENTS GmbH, Österreich
Photometer (Lambda EZ210)	Perkin Elmer
Mikroliterspritze	Hamilton [®] Bonaduz AG, Schweiz

2.5 Dichte-Gradienten-Zentrifugation

Die Dichte-Gradienten-Zentrifugation ist eine Methode, um mononukleäre Zellen aus Blut oder aspiriertem Knochenmark zu isolieren. Durch die entsprechende Dichte (1.077 g/ml) und osmotischen Eigenschaften der verwendeten Lymphoprep[®]-Lösung führt die Zentrifugation zur Ausbildung verschiedener Schichten, welche unterschiedliche Zelltypen enthalten (Abbildung 2.1).

?



?

Abbildung 2.1 Bildung von Schichten nach 20-minütiger Zentrifugation bei 1500 Umdrehungen pro Minute. Nach Zentrifugation enthält die unterste Schicht Erythrozyten, die durch das Zentrifugationsmedium (Lymphoprep[®]) aggregieren und deshalb vollständig sedimentieren. Wegen ihrer geringen Dichte werden Lymphozyten und Monozyten direkt oberhalb des Zentrifugationsmediums gefunden (Ficoll-Schicht). Andere langsam sedimentierenden Blutbestandteile, wie z.B. Thrombozyten und Plasma, bilden die oberste Schicht.

2.5.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmark

Das Knochenmark wurde direkt in eine Spritze mit Heparin aspiriert, um eine Koagulation zu verhindern. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Knochenmark durch einen Filter, der zuvor mit 1 ml PBS-Puffer benetzt wurde, in ein Falcon-Gefäß (50 ml) filtriert. Das filtrierte Knochenmark wurde 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Um eine optimale Ausbeute an Zellen zu erreichen, wurde der PBS-Puffer mit Hilfe einer Messpipette (10 ml) durch den Filter gegeben, der somit gewaschen wurde.

In einem weiteren Falcon-Gefäß (50 ml) wurde 15 ml Lymphoprep[®] vorgelegt und das verdünnte Blut mit einer Messpipette (10 ml) auf die Lymphoprep[®]-Lösung aufgeschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass sich das Knochenmark nicht mit dem Lymphoprep[®] vermischt.

Da üblicherweise ca. 20 ml Knochenmark zur Verfügung standen, wurde das mit PBS-Puffer verdünnte Knochenmark auf zwei Falcon-Gefäße verteilt. Das Knochenmark konnte jetzt für 20 min bei 20 °C, 1500 rpm und niedrigster Bremseinstellung zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation war die typische Schichtung in dem Falcon-Gefäß zu erkennen (Abbildung 2.1). Die Interphase mit den mononukleären Zellen (MNC) wurde mit einer Messpipette (5 ml) direkt abgesaugt und in ein neues Falcon-Gefäß (50 ml) überführt. Da beim Absaugen der Interphase auch Plasma in die Pipette gelangt, mussten die Zellen zweimal gewaschen werden. Dazu wurde das Plasma-Zell-Gemisch auf 40 ml mit PBS aufgefüllt und bei 1500 rpm für 10 min bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Falcon-Gefäß dekantiert und das Pellet wiederum mit PBS auf 40 ml aufgefüllt. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden bei 1500 rpm für 10 min bei 20 °C zentrifugiert, um eine optimale Zellausbeute zu erhalten. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit 1 x 700 µl PBS resuspendiert und in ein Falcon-Gefäß überführt. In dieser Zellsuspension erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und anschließend der Probentransport.

2.6 Zellzählung unter dem Mikroskop

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei einigen Proben unter dem Mikroskop mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Zur Vereinfachung der Zellzählung wurde ein Teil der Zellsuspension mit PBS-Puffer im Verhältnis 1 zu 50 verdünnt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 490 µl PBS-Puffer pipettiert. Je 10 µl verdünnte Zellsuspension wurde nun auf beiden Seiten der Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden

alle vier Quadrate mit 1 mm Seitenlänge (Abbildung 2.2), auf beiden Seiten der Zählkammer, ausgezählt.

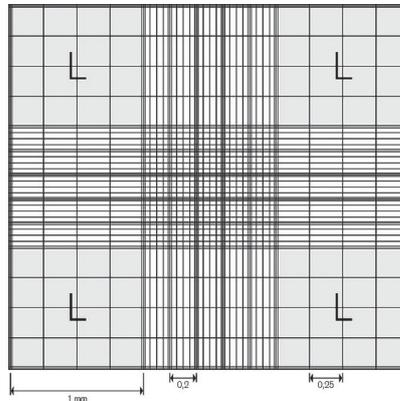


Abbildung 2.2 Zählfeld der Neubauer-Zählkammer. Alle Eckquadrate (hier mit L gekennzeichnet) wurden für beide Zählfelder ausgezählt.

Quelle:

http://catalog.brand.de/index.php?sTemplate=zoom&sTemplateFile=products_file_zoom.php&BILD=media/images/Produktbilder/Stammbild/717805_zoom.jpg (vom 12.12.2016)

Die Zellzahlen in den acht ausgezählten Quadraten wurden addiert und durch acht geteilt, um einen Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten. Dieser Mittelwert wurde mit 10^4 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro Milliliter (ml) zu erhalten. Da die Zellen vor dem Zählen 1 zu 50 verdünnt wurden, musste die errechnete Zellzahl mit 50 multipliziert werden.

2.7 Automatische Zellzählung

Bei den meisten Proben erfolgte die Zellzählung durch einen automatischen Hämatologie-Analysator (Sysmex KX-21N). Von den in PBS-Puffer suspendierten Zellen wurden 100 μl in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für die automatische Zellzählung verwendet. Hierbei werden 12 μl Zellsuspension von dem Zellzählgerät angesaugt und mit 2568 μl Diluterlösung verdünnt. Für die Erythrozyten- und Thrombozytenzählung werden 100 μl Zellsuspension benötigt, und der Rest mit einem Lysierreagenz auf 2,9 ml gebracht. Das Lysierreagenz lysiert die Erythrozyten und bringt die Leukozyten in eine definierte Form. Die Lösung wird durch eine Kapillare gezogen. Die beim Durchtritt einer Zelle durch die Kapillare

auftretende Widerstandsänderung ist direkt proportional zum Zellvolumen. Diese Widerstandsänderungen werden gemessen und hierdurch das Zellvolumen bestimmt. Leukozyten zwischen 35 fl und 90 fl werden als Lymphozyten gezählt, zwischen 90 fl und 160 fl als Monozyten und zwischen 160 fl und 450 fl als Granulozyten. Aus der Gesamtzahl der Zählereignisse wird die Leukozytenkonzentration bestimmt.

2.8 Probentransport

Die Entnahme der Knochenmarkproben, die Gewinnung der mononukleären Zellen durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation und die Zellzählung erfolgten im Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Die respirometrische Messung des Sauerstoffverbrauches am Oxygraphen-2K erfolgte an der Universität Bonn (Klinik für Epileptologie; Arbeitsgruppe von Professor Wolfram S. Kunz). Der Transport der Zellsuspension (PBS + Zellen) erfolgte gekühlt. Die Zeitspanne von der Knochenmarkpunktion in Düsseldorf bis zum Beginn der Respirometrie in Bonn beträgt im Durchschnitt 190 Minuten (maximal 220 Minuten, minimal 155 Minuten).

2.9 Der Oxygraph-2K

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs wurde der Oxygraph-2K der Firma Oroboros, Innsbruck (Österreich) verwendet.



Abbildung 2.3 Der Oxygraph-2K. Quelle: http://www.orooboros.at/?Protocols_titrations (vom 07.08.2015)

Der Oxygraph-2K ist ein Zwei-Kammer Titrations-Injektions-Respirometer, welches den Sauerstoffverbrauch der Zellen über die Zeit misst. Jede Kammer kann mithilfe eines Stopfens luftdicht verschlossen werden. Damit Substanzen auch nach dem Verschluss der Kammer noch hinzugefügt werden können, verfügt jeder Stopfen über eine dünne Kapillare. Hierüber können auch während der Messung Chemikalien mithilfe einer Injektionskanüle in die Kammern gegeben werden. Die Temperatur in den Kammern wird konstant bei 37 °C gehalten.

Zur Messung der Sauerstoffkonzentration befindet sich in jeder Kammer ein polarographischer Sauerstoffsensor (POS-Elektrode). Diese Sauerstoffsensoren bestehen aus einer Gold-Kathode und einer Silber-Anode. Die Elektroden sind von einer einmolaren Kaliumchloridlösung umgeben. Der gesamte Sensoraufbau ist mit einer sauerstoffdurchlässigen Teflonmembran ummantelt. Der Sauerstoff aus der Probe diffundiert durch die Teflonmembran in die Kaliumchloridlösung und wird durch die Kathode reduziert. Der dabei entstehende elektrochemische Stromfluss, der dem Sauerstoffpartialdruck in der Probe entspricht, wird in ein elektrisches Signal

umgewandelt. Der Sauerstoffsensor produziert somit ein elektrisches Signal, indem er den Sauerstoff an der Kathode verbraucht. Mithilfe eines elektromagnetischen Rührers wird eine optimale Durchmischung der Probe gewährleistet (Gnaiger E 2016).

2.10 SUIT-Protokoll (*Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll*)

Bei der Messung des Sauerstoffverbrauches durch das Respirometer wurde ein *SUIT*-Protokoll (*Substrate-Uncoupler-Inhibitor-Titration-Protokoll*) verwendet, bei dem schrittweise Substrate und Inhibitoren der Atmungskettenkomplexe in die einzelnen Messkammern appliziert werden. Hierdurch wird eine selektive Untersuchung der einzelnen Atmungskettenabschnitte ermöglicht.

Der Sauerstoffverbrauch wird gleichzeitig in zwei Kammern des Oxygraphen mit verschiedenen Protokollen gemessen. In Kammer A wird die Aktivität von Komplex I, III und IV und in Kammer B die Aktivität von Komplex II, III, und IV der Atmungskette gemessen.

2.10.1 Verwendete Substrate und Inhibitoren der Atmungskettenkomplexe

Rotenon: Blockiert durch Bindung an Komplex I der Atmungskette die Elektronenübertragung (Ravanel P, *et al.* 1984).

Digitonin: Führt zu einer selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran. Die Permeabilisierung bewirkt eine Angleichung des Zytosols mit dem extrazellulären Medium (Kuznetsov AV, *et al.* 2008).

Malat, Glutamat & Pyruvat: Durch ihre Verstoffwechslung entsteht NADH (Nicotinamidadenindinukleotid), welches von Komplex I der Atmungskette reduziert werden kann.

Succinat: Ist Substrat der Succinat-Dehydrogenase (entspricht der hydrophilen Untereinheit von Komplex II), die Succinat oxidiert. Hierbei entsteht FADH_2 (Flavin-Adenin-Dinukleotid), das seine Elektronen auf Ubichinon überträgt.

ADP: Führt als Substrat von Komplex V zu einer Erhöhung der Atmungsrate.

TTFB: Bewirkt eine Entkopplung der Atmungskette und somit zur Steigerung der Atemrate auch ohne Anwesenheit von ADP (Beechey RB 1966).

TMPD & Ascorbat: TMPD ist ein künstlicher Elektronen-Donator für Komplex IV der Atmungskette. Das Ascorbat reduziert in diesem Zusammenhang die Oxidation von TMPD (West PA, *et al.* 1978).

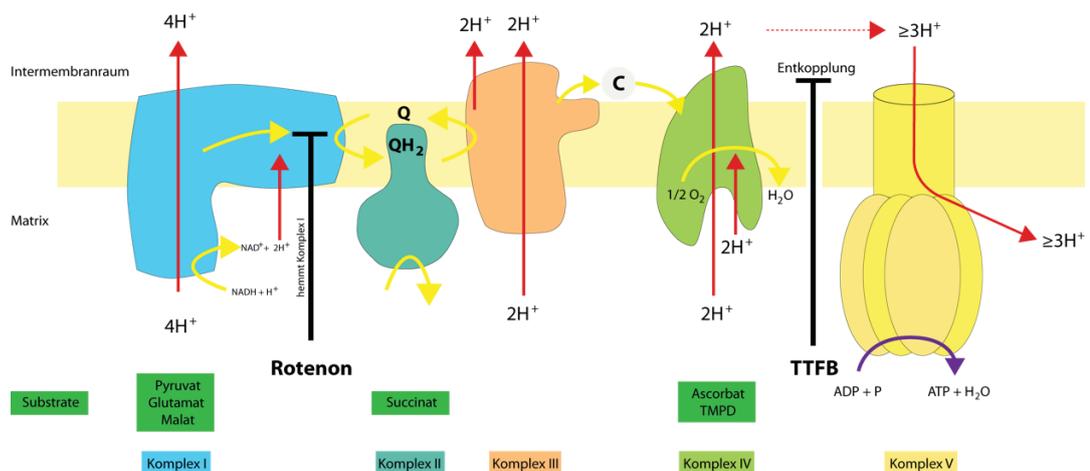


Abbildung 2.4 Komplexe (I-IV) der mitochondrialen Atmungskette. Q/QH_2 = Ubichinon; C = Cytochrom-c. (Abbildung modifiziert nach Löffler G und Petrides PE 2003.)

2.11 Vorbereitung des Oxygraph-2K für die Messung

Die beiden Kammern des Oxygraphen werden vor jeder Messung einmal mit Ethanol (70 %), dreimal mit Aqua dest. und einmal mit MilliQ[®]-Wasser gespült. Das MilliQ[®]-Wasser verbleibt in den Kammern, um ein Austrocknen der Sauerstoffsensoren zu verhindern. Bevor das Inkubationsmedium in die Kammern pipettiert werden kann, muss es mithilfe einer Sprudelpumpe für circa 5 Minuten mit Sauerstoff gesättigt werden. Danach wird das MilliQ[®]-Wasser aus den Kammern pipettiert, 1,922 ml Inkubationmedium in die linke Kammer A und 1,952 ml Inkubationmedium in die rechte Kammer B pipettiert. Da beide Kammern die Atmungsraten von unterschiedlichen Komplexen der mitochondrialen Atmungskette messen, werden unterschiedliche Substanzen in die Kammern hinzugefügt. Die linke Kammer misst die Atmungsrate von Komplex I, III und IV. Es wird hier 7 µl MgCl, 10,5 µl Malat und 21 µl Glutamat in die Kammer pipettiert.

Die rechte Kammer misst die Atmungsrate von Komplex II, III und IV. Es wird hier 7 µl MgCl und 1,05 µl Rotenon in die Kammer pipettiert. Das Rotenon verhindert die Elektronenübertragung von Komplex I auf Ubichinon und gilt somit als selektiver Hemmstoff von Komplex I (Ravanel P, *et al.* 1984).

Zur Kalibrierung des Oxygraphen werden beide Kammern mit einem Stopfen verschlossen, so dass eine Luftblase in den Kammern zu erkennen ist. Die Kammern bleiben so lange geöffnet, bis sich die Atemrate in den Kammern stabilisiert hat. Dies kann an einem Computer, der mit dem Oxygraphen verbunden ist, mithilfe der Software (DatLab 4, Oroboros Instruments GmbH) abgelesen werden. Hat sich die Atemrate stabilisiert, können die Kammern luftdicht geschlossen werden. Dazu werden die Stopfen weiter zugezogen, bis die Luftblase in der Kammer verschwunden ist und Flüssigkeit aus der Öffnung im Stopfen tritt. Sobald sich die Veränderung des O₂-Gehaltes wieder stabilisiert hat, können die Zellen in die Kammern injiziert werden.

2.12 Ablauf der Messung

Die Zellen werden mit 92 μl Inkubationsmedium resuspendiert, so dass insgesamt circa 100 μl Zellsuspension in eine Glasspritze aufgezogen werden können. Die Zellen werden in die entsprechende Kammer gespritzt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen in die Kammern gelangen.

Nachdem sich die Veränderung der Atemrate (gemessen in $\text{pmol} / (\text{sek} * \text{ml})$, siehe Abbildung 2.5) stabilisiert hat, können nacheinander Substrate (siehe Tabelle 2.2) in die Kammern gespritzt werden. Ascorbat und TMPD werden direkt hintereinander gespritzt. Die hier entstehende höchste Atemrate ist für die Auswertung relevant. Die Reihenfolge und teilweise auch die Substanzen sind für beide Kammern unterschiedlich (siehe Tab. 2.2).

Kammer A: Atemrate		Kammer B: Atemrate	
	<i>ROUTINE</i>		
		21 μl Succinat (1 M)	
7 μl Digitonin (5 mg / ml)	<i>LEAK_{GM}</i>	7 μl Digitonin (5 ng / ml)	<i>LEAK_{Rot+suc}</i>
8,4 μl ADP (0,5 M)	<i>OXPHOS-CI_{GM}</i>	8,4 μl ADP (0,5 M)	<i>OXPHOS-CII_{Rot+suc}</i>
21 μl Pyruvat (1 M)	<i>OXPHOS-CI_{GM+P}</i>		
2,1 μl TTFB (200 μM) (3x)	<i>ETS-CI_{GM+P}</i>	2,1 μl TTFB (200 μM) (3x)	<i>ETS-CI_{Rot+suc}</i>
21 μl Ascorbat (50 mM; pH 7,4) 21 μl TMPD (5,93mg / ml)	<i>COX</i>		

Tabelle 2.2 Substrate / Entkoppler und die induzierten Atemraten in chronologischer Reihenfolge für Kammer A und Kammer B des Oxygraphen. CI = Komplex I; CII = Komplex II; _{GM} = Glutamat und Malat; _p = Pyruvat; _{Rot+Suc} = Rotenon und Succinat

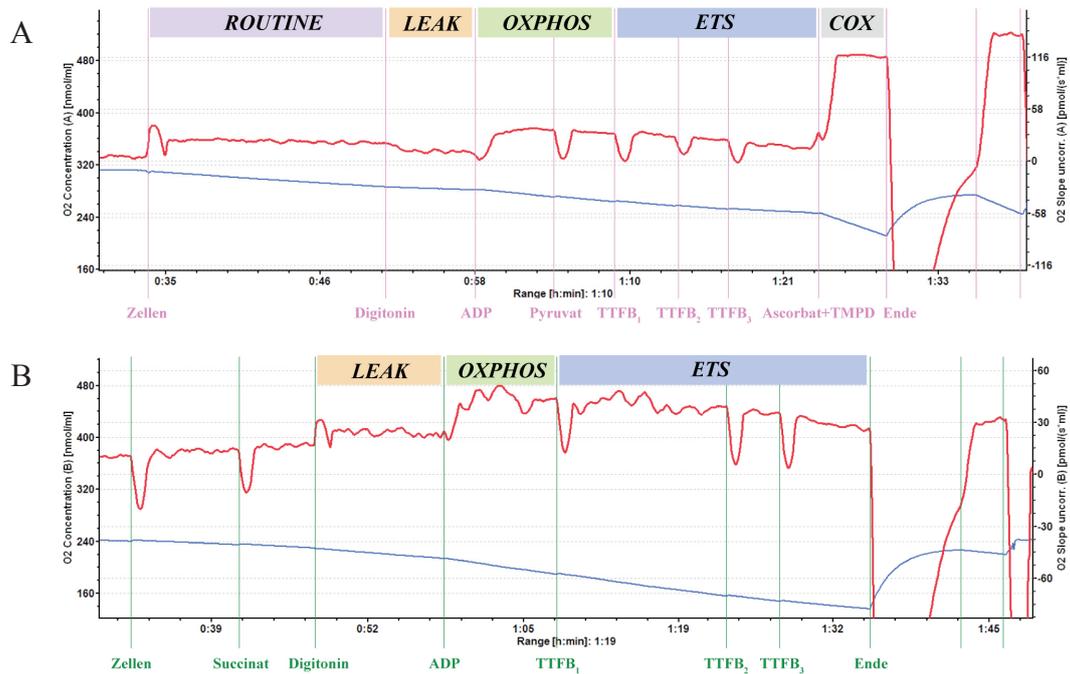


Abbildung 2.5 Graphische Darstellung der Sauerstoffkonzentration (blaue Kurven; linksseitige Ordinate) und die Atemrate (rote Kurven; rechtsseitige Ordinate) in Messkammer A (A) und Messkammer B (B) während der Messung des Oxygraphen. Die Atemrate entspricht dabei der Ableitung der Sauerstoffkonzentration. Die Abszissen zeigen die Zeit und die Zugabe (rosa bzw. grün) von Substraten / Entkopplern in die Messkammern. In dem jeweiligen oberen Abschnitt werden die definierten Zustände aufgelistet (lila = ROUTINE-Atmung, State 1; rot = LEAK-Atmung, State 4; hellgrün = Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), State 3; blau = Kapazität des Elektronentransportsystems (ETS), entkoppelt; grau = Kapazität der Cytochrom-c-Oxidase (COX).

Nachdem in beiden Kammern die jeweils letzte Substanz hinzugefügt wurde und sich die Veränderung der Respiration entsprechend eingestellt hat, wird der gesamte Inhalt aus Kammer B in ein Falcon-Gefäß pipettiert und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine spätere Proteinbestimmung eingefroren.

Die Erfassung der Messdaten erfolgt über einen mit dem Oxygraphen verbundenen Computer. Der gemessene Sauerstoffverbrauch wird bei der statistischen Analyse um den Sauerstoffverbrauch durch Materialien der Messkammern (z.B. POS-Elektrode) korrigiert. Hierzu wurde der Sauerstoffverbrauch vor Zugabe der Zellen in den Messkammern bestimmt. Dieser Sauerstoffverbrauch, der nicht durch die Zellatmung entsteht, wird in der Nachbearbeitung dem Sauerstoffverbrauch für jede Atemrate abgezogen.

2.13 Proteinbestimmung nach Lowry

Damit der Sauerstoffverbrauch bezogen auf die Proteinkonzentration angegeben werden kann, wird die Proteinkonzentration von jeder gemessenen Probe aus kryokonservierten Proben photometrisch bestimmt.

Die Proteinbestimmung nach Lowry basiert auf zwei chemischen Reaktionen. Die erste ist die Biuretreaktion, bei der die Peptidbindungen der Proteine einen Komplex mit den Kupfer (II) - Ionen in alkalischer Lösung eingehen. Diese Komplexbildung geht mit einem blau-violetten Farbumschlag einher.

Bei der zweiten Reaktion wird Kupfer (II) zu Kupfer (I) reduziert, wobei das entstandene einwertige Kupfer das Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdänblau reduziert. Die Intensität der Blaufärbung nimmt mit dem Proteingehalt in der Lösung zu, so dass die Proteinkonzentration photometrisch bei 750 nm bestimmt werden kann. Die Proteinbestimmung wurde mit Präzipitation der Proteine nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.14 Auswertung und Statistik

Die Erfassung und Analyse der Messdaten des Oxygraphen erfolgte mit der Software DatLab 4 (OROBOROS[®]-INSTRUMENTS). Die statistischen Berechnungen, die Erstellung der Tabellen, Diagramme und Grafiken erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2010 und Adobe Illustrator CS4. Die Ergebnisse werden als Absolutwerte oder Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die p-Werte stellen die zweiseitige statistische Signifikanz dar, die mit Hilfe des Student'schen t-Tests berechnet wurden.

3 Ergebnisse

Die Meßergebnisse von insgesamt 18 Patienten konnten zur statistischen Auswertung herangezogen werden. Die Daten von vier Patienten mussten verworfen werden, da ihre endgültigen hämatologischen Diagnosen weder in die Gruppe myelodysplastischer Syndrome noch in die unauffällige Kontrollgruppe eingeordnet werden konnten.

3.1 Zellzahl und Proteingehalt

Der gemessene Sauerstoffverbrauch wird als sogenannte Atemrate angegeben. Die Atemrate wird pro eine Million Zellen ($\text{nmol} / (\text{min} * 10^6 \text{ Zellen})$) und pro μg Protein ($\text{pmol} / (\text{min} * \mu\text{g})$) angegeben. Daher wurden von jeder Probe die Zellzahl und der Proteingehalt bestimmt. Bei den Proben der Patienten #2, #3 und #4 wurde die Zellzahl manuell, d. h. mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Bei allen anderen Proben wurde die Zellzahl mithilfe eines automatischen Zellzählers bestimmt.

3.1.1 Sauerstofffluss bezogen auf die Zellzahl

Der Sauerstofffluss wird in Bezug zur Zellzahl von jeder Probe ermittelt. Durch Titration verschiedener Substanzen (*SUIT*-Protokoll) werden verschiedene Gleichgewichtszustände erreicht. Tabelle 3.1 zeigt den Sauerstofffluss in jedem gemessenen Gleichgewichtszustand bezogen auf die Zellzahl. Die Angaben werden in nmol / (min * 10⁶ Zellen) gemacht. Angegeben werden: ROUTINE-Atmung (endogene Ruheatmung), LEAK-Atmung (Zustand 4), OXPHOS-Atmung (Zustand 3), ETS-Atmung (Elektronen Transfer System-Atmung, entkoppelter Zustand) jeweils nach Titrierung von TTFB in drei Schritten und die Cytochrome c-Oxidase-Aktivität (COX, Komplex IV-Aktivität). Die Gleichgewichtszustände werden unter Stimulation von Komplex I- oder Komplex II-Substraten (CI oder CII) gemessen. Komplex I-Substrate Glutamat (G), Malat (M), Pyruvat (P) und Komplex II-Substrat Succinat (Suc) unter Hemmung von Komplex I durch Rotenon (Rot).

Probe	ROUTINE	LEAK		OXPHOS			ETS1	ETS2	ETS3	ETS1	ETS2	ETS3	COX	
		CI GM	CII Rot+Suc	CI GM	GM+P	CII Rot+Suc	GM+P	CI GM+P	GM+P	Rot+Suc	CII Rot+Suc	Rot+Suc	CIV	
Kontrolle	#3	0,055	0,052	0,012	0,090	0,074	0,012	0,122	0,135	0,084	0,008	0,135	0,084	0,788
	#2	0,062	0,014	0,043	0,029	0,018	0,045	0,013	0,007	0,004	0,032	0,007	0,004	0,355
	#13	0,083	0,053	0,078	0,067	0,060	0,149	0,043	0,028	0,034	0,083	0,028	0,034	0,773
	#15	0,116	0,047	0,083	0,093	0,050	0,234	0,051	0,036	0,021	0,137	0,036	0,021	0,587
	#18	0,136	0,097	0,107	0,312	0,291	0,349	0,266	0,221	0,188	0,342	0,221	0,188	2,272
	#20	0,076	0,052	0,084	0,097	0,076	0,221	0,097	0,066	0,057	0,195	0,066	0,057	1,095
	#21	0,069	0,110	0,297	0,186	0,207	0,391	0,132	0,127	0,119	0,290	0,127	0,119	4,853
	#22	0,144	0,075	0,116	0,203	0,166	0,395	0,056	0,010	0,033	0,240	0,010	0,033	0,865
	#23	0,132	0,048	0,091	0,177	0,057	0,149	0,045	0,031	0,033	0,114	0,031	0,033	0,731
	#24	0,167	0,057	0,192	0,298	0,258	0,479	0,215	0,186	0,094	0,400	0,186	0,094	1,101
MDS	#4	0,026	0,011	0,047	0,018	0,009	0,099	0,008	0,003	0,004	0,087	0,003	0,004	0,538
	#9	0,033	0,037	0,008	0,026	0,017	0,228	0,006	0,011	0,006	0,149	0,011	0,006	0,922
	#11	0,113	0,069	0,109	0,338	0,335	0,380	0,311	0,207	0,082	0,351	0,207	0,082	1,344
	#12	0,125	0,074	0,114	0,239	0,234	0,379	0,253	0,161	0,077	0,368	0,161	0,077	0,477
	#14	0,112	0,066	0,098	0,143	0,131	0,291	0,130	0,103	0,070	0,290	0,103	0,070	1,992
	#16	0,119	0,055	0,115	0,215	0,199	0,390	0,209	0,170	0,124	0,366	0,170	0,124	0,783
	#19	0,178	0,120	0,193	0,342	0,243	0,517	0,176	0,132	0,085	0,493	0,132	0,085	1,320
	#25	0,206	0,082	0,195	0,367	0,313	0,719	0,308	0,124	0,057	0,627	0,124	0,057	0,641

Tabelle 3.1 Sauerstofffluss mononukleärer Knochenmarkzellen bei Kontrollen und MDS-Patienten.

In den folgenden Diagrammen wird der Sauerstofffluss für jeden Abschnitt der Messung dargestellt (Abbildung 3.1).

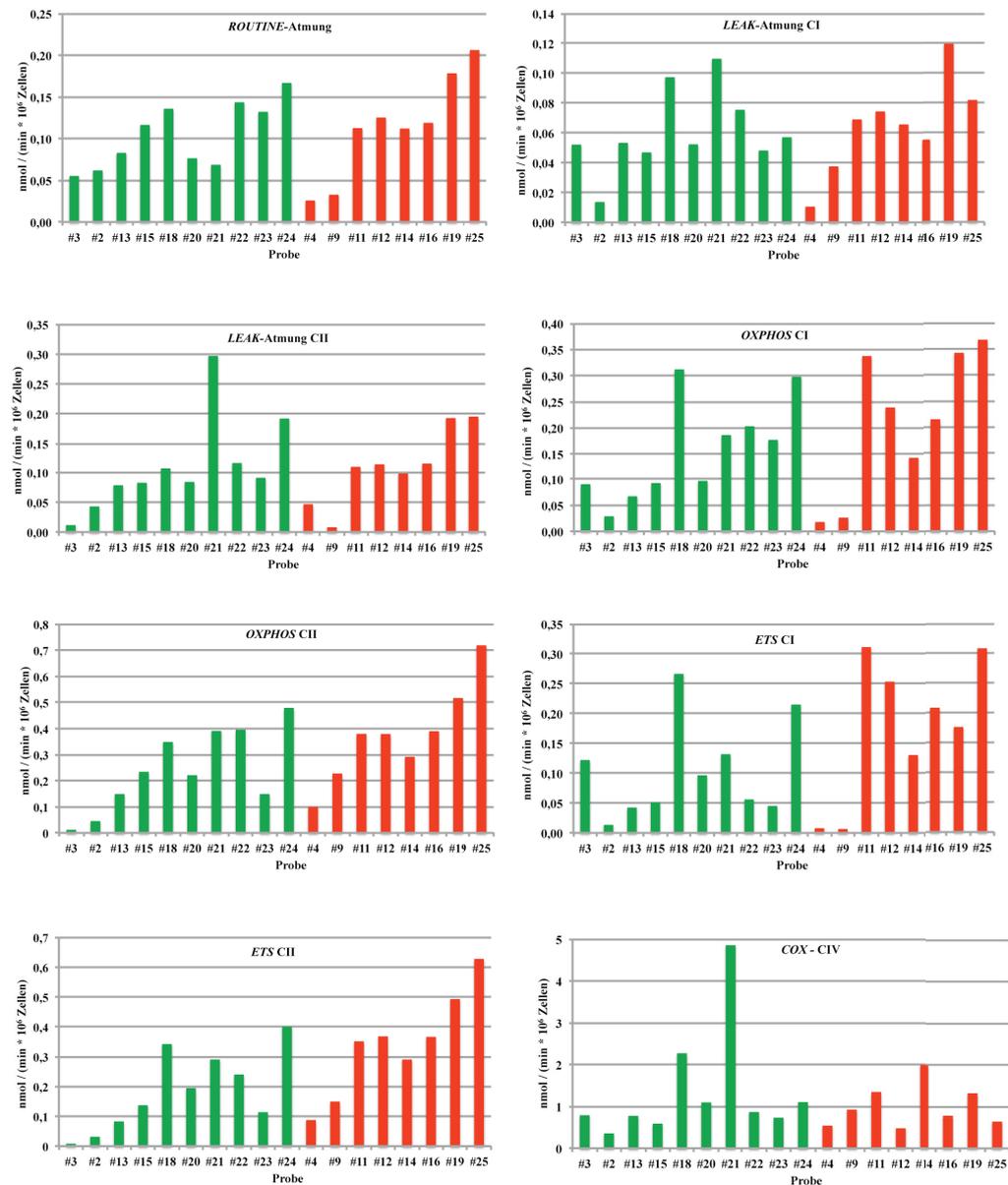


Abbildung 3.1 Sauerstoffflüsse in Bezug zur Zellzahl (nmol / (min * 10⁶ Zellen)) während unterschiedlicher Gleichgewichtszustände (*ROUTINE*, *LEAK*, *OXPHOS*, *ETS*) und die Kapazität der Komplex IV-Atmung (*COX CIV*) mononukleärer Knochenmarkzellen bei MDS-Patienten (rote Balken) und Kontrollen (grüne Balken).

3.1.2 Mittelwerte des Sauerstoffflusses bezogen auf die Zellzahl

Der Sauerstofffluss als Mittelwert für Kontrollen und MDS-Patienten wird in Abbildung 3.2 bezogen auf die Zellzahl dargestellt.

ROUTINE = endogene Atmung = Zustand 1, LEAK = Zustand 4, OXPPOS = Zustand 3, ETS = Entkoppelter Zustand; CI = hohe Konzentrationen von Komplex I-Substraten Glutamat und Malat (GM); CII = hohe Konzentrationen von Komplex II-Substrat Succinat (Suc) und Komplex I Hemmer (Rotenon). CIV = maximale Kapazität des Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) unter Stimulation von TMPD (Tetramethylphenylendiamin) und Ascorbat.

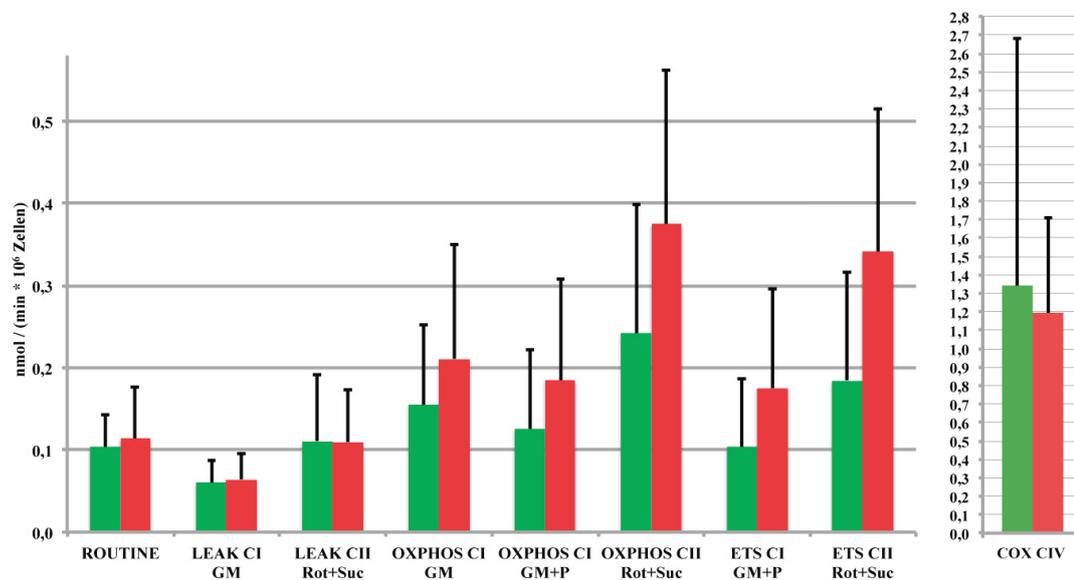


Abbildung 3.2 Mittelwerte des Sauerstoffflusses der einzelnen Gleichgewichtszustände.

3.1.3 Sauerstofffluss bezogen auf den Proteingehalt

Der Sauerstofffluss, der in den Kammern des Oxygraphen gemessen wird, wird zusätzlich bezogen auf den Proteingehalt in picomol pro Minute und Mikrogramm Protein (pmol / (min * μg)) angegeben. Der Proteingehalt der Proben wurde photometrisch (nach Lowry) gemessen und in Abbildung 3.3 dargestellt. Die grünen Balken zeigen die Kontrollen, die roten Balken zeigen die MDS-Zellen. Die gestrichelten Linien zeigen die Mittelwerte der beiden Gruppen an. Der Unterschied im Proteingehalt ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,25$).

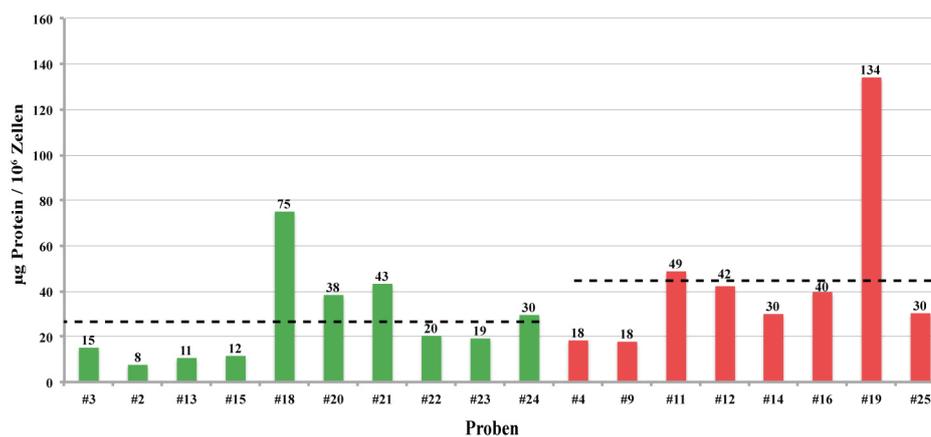


Abbildung 3.3 Proteingehalt mononukleärer Knochenmarkzellen bei MDS-Patienten und Kontrollen. Der Proteingehalt wird in $\mu\text{g Protein pro } 10^6 \text{ Zellen}$ für jede Probe einzeln angegeben.

Tabelle 3.2 zeigt den Sauerstofffluss in den verschiedenen Gleichgewichtszuständen bezogen auf den Proteingehalt. Die Angaben werden in pmol / (min * 106 Zellen) gemacht. Angegeben werden: ROUTINE-Atmung (endogene Ruheatmung), LEAK-Atmung (Zustand 4), OXPHOS-Atmung (Zustand 3), ETS-Atmung (Elektronen Transfer System-Atmung, entkoppelter Zustand) jeweils nach Titrierung von TTFB in drei Schritten und die Cytochrom c-Oxidase-Aktivität (COX, Komplex IV-Aktivität). Die Gleichgewichtszustände werden unter Stimulation von Komplex I- oder Komplex II-Substraten (CI oder CII) gemessen. Komplex I-Substrate Glutamat (G), Malat (M), Pyruvat (P) und Komplex II-Substrat Succinat (Suc) unter Hemmung von Komplex I durch Rotenon (Rot).

Probe	ROUTINE	LEAK		OXPHOS			ETS1	ETS2	ETS3	ETS1	ETS2	ETS3	COX	
		CI GM	CII Rot+Suc	CI GM	CI GM+P	CII Rot+Suc	GM+P	CI GM+P	GM+P	Rot+Suc	CII Rot+Suc	Rot+Suc	CIV	
Kontrolle	#3	3,67	3,47	0,78	6,00	4,94	0,77	8,12	9,01	5,62	0,57	0,65	0,66	52,48
	#2	8,15	1,81	5,67	3,83	2,39	5,98	1,76	0,95	0,57	4,16	3,38	2,12	46,81
	#13	7,81	5,03	7,39	6,33	5,68	14,05	4,01	2,69	3,19	7,83	5,51	5,61	72,92
	#15	10,04	4,05	7,13	7,98	4,30	20,18	4,40	3,12	1,78	11,82	5,95	2,50	50,65
	#18	1,81	1,30	1,42	4,16	3,87	4,64	3,55	2,94	2,50	4,56	3,56	2,48	30,26
	#20	1,99	1,36	2,19	2,52	1,98	5,75	2,51	1,70	1,47	5,06	4,34	3,21	28,49
	#21	1,57	2,51	6,79	4,26	4,72	8,93	3,01	2,90	2,71	6,64	5,35	3,52	110,93
	#22	7,03	3,70	5,67	9,96	8,13	19,37	2,75	0,48	1,62	11,76	6,80	4,25	42,40
	#23	6,88	2,51	4,74	9,23	2,98	7,77	2,34	1,61	1,69	5,94	3,92	1,62	38,09
#24	5,62	1,92	6,47	10,04	8,71	16,15	7,25	6,27	3,17	13,49	7,70	3,43	37,09	
MDS	#4	1,40	0,58	2,54	0,98	0,48	5,43	0,43	0,18	0,24	4,78	3,31	2,49	29,38
	#9	1,85	2,12	0,46	1,48	0,96	12,85	0,36	0,62	0,36	8,43	4,40	2,33	52,08
	#11	2,31	1,41	2,24	6,91	6,85	7,78	6,37	4,24	1,69	7,19	5,65	3,32	27,53
	#12	2,97	1,76	2,69	5,67	5,55	8,98	6,00	3,82	1,82	8,72	7,49	3,04	11,31
	#14	3,76	2,20	3,30	4,79	4,39	9,79	4,38	3,47	2,36	9,75	7,66	4,92	66,93
	#16	3,00	1,40	2,90	5,43	5,04	9,84	5,27	4,29	3,14	9,25	7,19	4,42	19,77
	#19	1,33	0,89	1,44	2,55	1,81	3,86	1,32	0,99	0,63	3,68	2,58	1,82	9,85
	#25	6,83	2,71	6,46	12,17	10,36	23,81	10,21	4,10	1,87	20,78	10,28	4,45	21,22

Tabelle 3.2 Sauerstofffluss mononukleärer Knochenmarkzellen von Kontrollen und MDS-Patienten.

In den folgenden Diagrammen wird der Sauerstofffluss für jeden Abschnitt der Messung dargestellt (Abbildung 3.4).

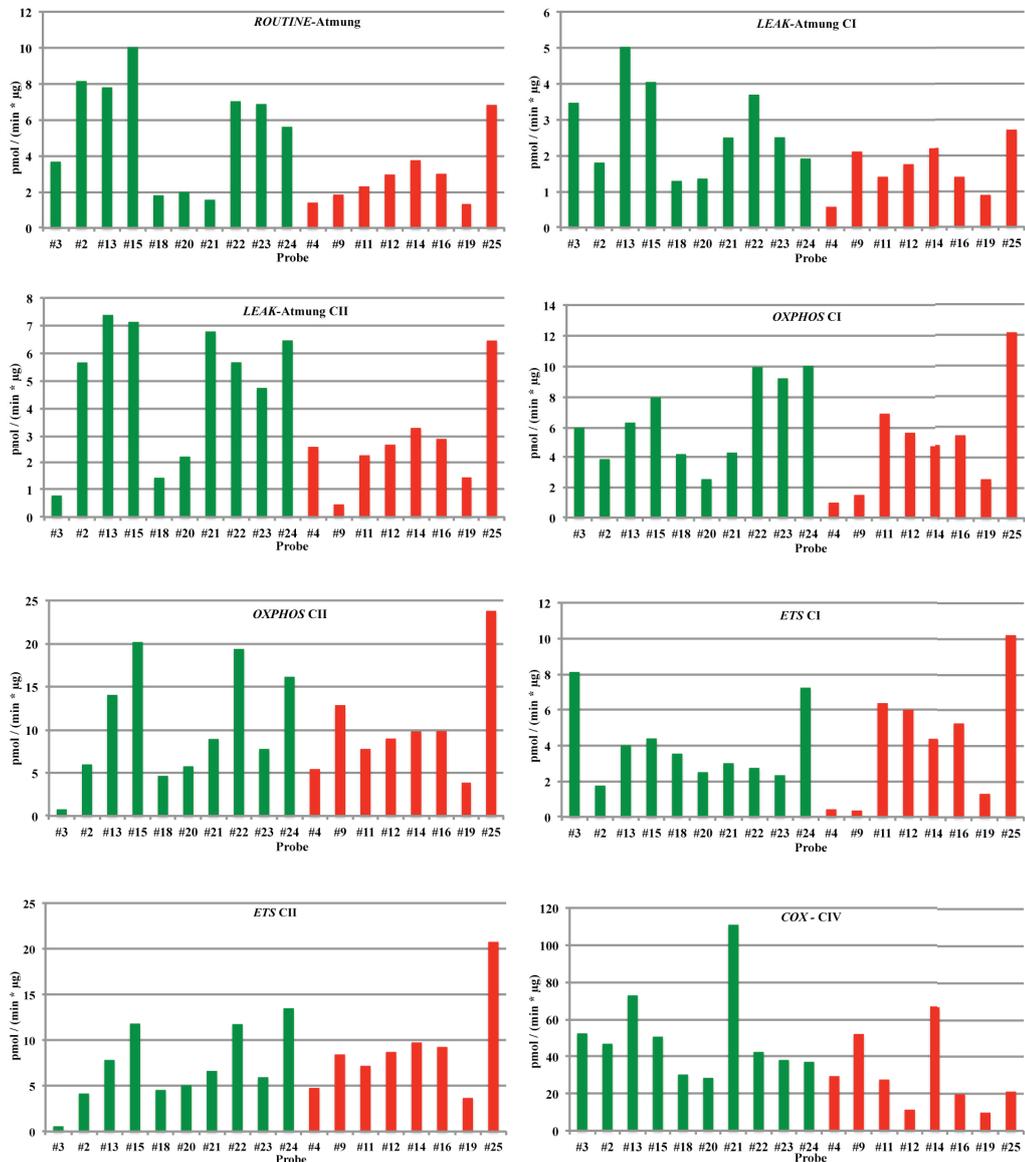


Abbildung 3.4 Sauerstoffflüsse bezogen auf den Proteingehalt (pmol / (min * 10⁶ Zellen)) während unterschiedlicher Gleichgewichtszustände (*ROUTINE*, *LEAK*, *OXPHOS*, *ETS*) und die Kapazität der Komplex IV-Atmung (*COX CIV*) mononukleärer Knochenmarkzellen von MDS-Patienten (rote Balken) und Kontrollen (grüne Balken).

3.1.4 Mittelwerte des Sauerstoffflusses bezogen auf den Proteingehalt

Der Sauerstofffluss als Mittelwert für Kontrollen und MDS-Patienten wird in Abbildung 3.5 bezogen auf den Proteingehalt dargestellt.

ROUTINE = endogene Atmung = Zustand 1, LEAK = Zustand 4, OXPHOS = Zustand 3, ETS = Entkoppelter Zustand; CI = hohe Konzentrationen von Komplex I-Substraten Glutamat und Malat (GM); CII = hohe Konzentrationen von Komplex II-Substrat Succinat (Suc) und Komplex I Hemmer (Rotenon). CIV = maximale Kapazität des Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) unter Stimulation von TMPD (Tetramethylphenyldiamin) und Ascorbat. Ein statistisch signifikanter Unterschied besteht für die ROUTINE- ($p = 0,043$) und die LEAK-CI-Atmung ($p = 0,029$).

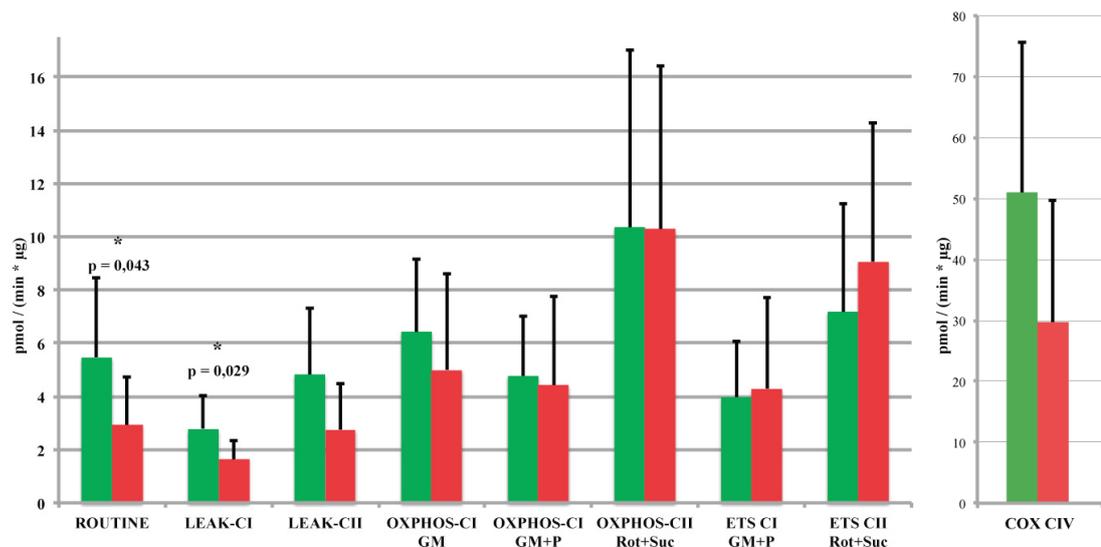


Abbildung 3.5 Mittelwerte des Sauerstoffflusses der einzelnen Gleichgewichtszustände. Der Stern (*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$).

3.2 Parameter der respiratorischen Kontrolle

Die verschiedenen Atemraten können miteinander in Beziehung gesetzt werden, um das Verhalten der Mitochondrien bzw. der Atmungskette unter experimentellen Voraussetzungen quantifizieren zu können. Ein häufig verwendeter Parameter, um die Funktion von Mitochondrien *in vitro* beurteilen zu können, ist die *Respiratory Control Ratio* (RCR). Sie zeigt das Verhältnis von OXPHOS-Atemrate (Zustand 3) und LEAK-Atemrate (Zustand 4) an (siehe Abbildung 3.6). Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen (grüne Balken) und MDS-Patienten (rote Balken) sowohl für die RCR mit Komplex I-Substraten ($p = 0,49$) als auch für die RCR mit Komplex II-Substraten ($p = 0,24$).

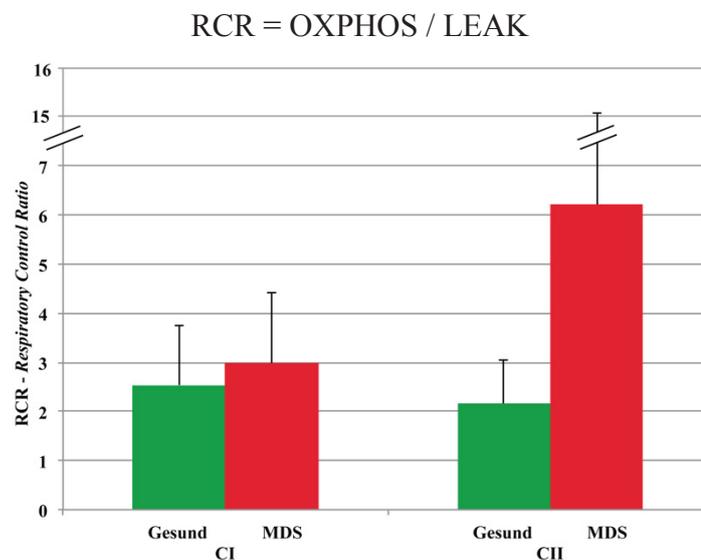


Abbildung 3.6 *Respiratory Control Ratio* (RCR = Zustand 3 / Zustand 4) unter Stimulation von Komplex I-Substraten (CI) und unter Stimulation von Komplex II-Substraten (CII). In die Auswertung werden zehn Proben der Kontrollen (grüne Balken) und acht Proben von MDS-Patienten (rote Balken) einbezogen.

Da die RCR-Werte zwischen eins und unendlich liegen können, überschätzen die errechneten RCR-Werte die Funktion von Mitochondrien tendenziell. Um dieses statistische Problem zu umgehen, kann die Formel der RCR so umgewandelt werden, dass man eine Linearisierung der Werte erhält. Die Effizienz der an die ATP-Bildung gekoppelten oxidativen Phosphorylierung wird dann als *Oxphos Coupling Efficiency* ($j_{\approx P}$) berechnet (siehe Abbildung 3.7):

$$j_{\approx P} = 1 - (\text{LEAK} / \text{OXPHOS})$$

Es findet sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen (grüne Balken) und MDS-Patienten (rote Balken) für die Oxphos Coupling Efficiency mit Komplex II-Substraten ($p = 0,015$); für Komplex I-Substrate besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,925$).

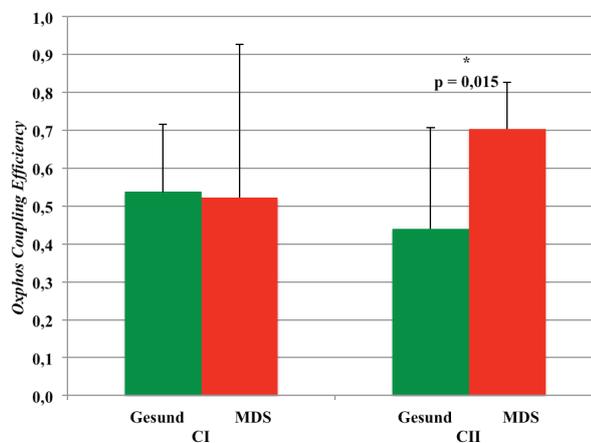


Abbildung 3.7 *Oxphos Coupling Efficiency* ($j_{\approx P}$) unter Stimulation von Komplex I-Substraten (CI) und unter Stimulation von Komplex II-Substraten (CII). In die Auswertung werden zehn Proben der Kontrollen (grüne Balken) und acht Proben von MDS-Patienten (rote Balken) einbezogen.

Die *Routine Coupling Efficiency* ($j_{\approx R}$) ist ein Parameter, der die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung an intakten Zellen widerspiegelt. Hierbei wird die ROUTINE-Atemrate um die LEAK-Atemrate korrigiert:

$$j_{\approx R} = 1 - (\text{LEAK} / \text{ROUTINE})$$

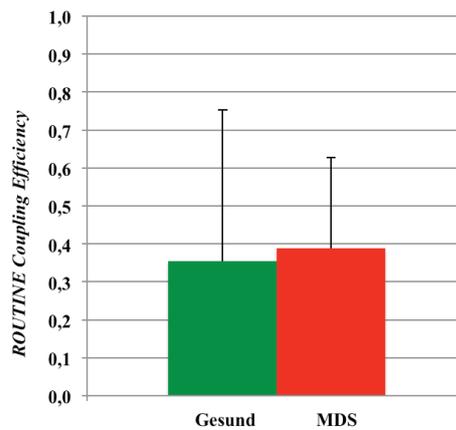


Abbildung 3.8 *Routine Coupling Efficiency* ($j_{\approx R}$) von Kontrollen (grüner Balken; zehn Proben) und MDS-Patienten (roter Balken; acht Proben).

4 Diskussion

Bezüglich der Pathogenese myelodysplastischer Syndrome gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der Mitochondrien (siehe 1.4). Hierbei könnte eine Hauptfunktion der Mitochondrien, die Generierung von Energie im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung, beeinträchtigt sein. Enzymatische Analysen sind weit verbreitet, um die mitochondriale Funktion zu messen. Es stellte sich jedoch heraus, dass hierbei mögliche Funktionsstörungen nicht ausreichend erfasst werden können, da keine Aussage darüber getroffen werden kann, wie die einzelnen Enzymkomplexe miteinander interagieren. (Saks VA, *et al.* 1998; Villani G, *et al.* 1998; Kunz WS, *et al.* 2000; Milner DJ, *et al.* 2000; Frezza C, *et al.* 2007). Folglich sollten Funktionsanalysen der oxidativen Phosphorylierung an intakten Mitochondrien erfolgen. Eine Möglichkeit, die Funktion der oxidativen Phosphorylierung an intakten Mitochondrien zu messen, bietet die hochauflösende Respirometrie.

Untersuchungen, bei denen intakte Zellen verwendet werden, entsprechen am ehesten den *in vivo* Bedingungen. Allerdings können dann keine Messungen mit bestimmten Effektoren (z.B. ADP) durchgeführt werden, weil diese die Zellmembran nicht passieren können. Hierzu müssen entweder die Mitochondrien isoliert oder die Zellen permeabilisiert werden. Bei der Isolation von Mitochondrien ergeben sich einige Nachteile: (1) Veränderung mitochondrialer Eigenschaften durch die Isolierungsschritte, (2) Selektion bestimmter Mitochondrienpopulationen, (3) Bedarf großer Zellmengen, um eine optimale Ausbeute von Mitochondrien zu erhalten, (4) unterbrochene Interaktion von Mitochondrien mit der Zelle, bei der Mikrokompimente, Metabolit-Kanalisation und intrazellulärer Energietransport eine wichtige Rolle spielen. Durch Permeabilisierung der Zellen können die genannten Nachteile der Mitochondrienisolierung weitestgehend vermieden und die

Möglichkeiten der experimentellen Manipulation beibehalten werden (Kuznetsov AV, *et al.* 2008).

Ausgehend von der Hypothese, dass Defekte in der mitochondrialen Atmungskette mit konsekutiver Verringerung der Atmungsaktivität die Entstehung eines myelodysplastischen Syndroms begünstigen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Atmungsaktivität von mononukleären Knochenmarkzellen durch Messung des Sauerstoffverbrauches mithilfe der hochauflösenden Respirometrie untersucht.

Im Unterschied zu früheren Untersuchungen von Bowen und Peddie (2002) wurde bei unseren Untersuchungen ein *SUIT*-Protokoll (*substrate-uncoupler-inhibitor-titration*-Protokoll) verwendet, um mögliche funktionelle Störungen einzelner Atmungskettenkomplexe zu identifizieren. Teil dieses Protokolls ist auch die Verwendung von Digitonin zur Permeabilisierung der Zellen, wobei die mitochondriale Funktion erhalten bleibt und Effektoren die Zellmembran passieren können (Vercesi AE, *et al.* 1991; Gnaiger E, *et al.* 1998 b). Die Stimulation der mitochondrialen Atmungskette durch Substrate wird dadurch erst ermöglicht.

Bowen und Peddie führten ihre Untersuchungen an intakten Zellen in einem Inkubationsmedium mit ADP durch. Die Zugabe von ADP in eine Zellsuspension von intakten Zellen führt jedoch nicht zu einer Stimulation der Atemrate. Dies konnte Steinlechner-Maran, *et al.* (1997) an menschlichen Endothelzellen aus Umbilikalvenen zeigen. Bei den Versuchen von Bowen und Paddie wurde folglich der endogene Sauerstoffverbrauch (ROUTINE-Atmung) der Zellen gemessen. Eine Stimulation der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) oder des Elektronen-Transport-Systems (ETS) war nicht möglich.

Bei unseren Versuchen wurden in den beiden Messkammern des Oxygraphen gleichzeitig zwei *SUIT*-Protokolle angewendet, um verschiedene Atemraten unter

Stimulation mit bestimmten Substraten zu messen.

In Kammer A des Oxygraphen wurde zu Beginn der Messung die ROUTINE-Atmung bestimmt. Die ROUTINE-Atmung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen MDS-Patienten und Kontrollen, wenn der Sauerstoffverbrauch bezogen auf die Zellzahl angegeben wird (Abbildung 3.2). Bezieht man den Sauerstoffverbrauch auf den Proteingehalt (Abbildung 3.5), zeigte sich bei den MDS-Patienten eine niedrigere ROUTINE-Atemrate ($2,93 \text{ pmol} / (\text{min} * \mu\text{g})$) als bei den Kontrollen ($5,46 \text{ pmol} / (\text{min} * \mu\text{g})$). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant ($p = 0,043$).

Im nächsten Schritt wurde die LEAK_{GM} -Atmung (Kammer A des Oxygraphen) und die $\text{LEAK}_{\text{ROT+Suc}}$ -Atmung (Kammer B des Oxygraphen) gemessen. Die LEAK-Atmung ist die Zellatmung, die nicht an die Phosphorylierung von ADP gekoppelt ist. Für die LEAK_{GM} -Atmung zeigten die Zellen von Kontrollpersonen bezogen auf den Proteingehalt mit $2,76 \text{ pmol} / (\text{min} * \mu\text{g})$ einen signifikant (p -Wert 0,03) höheren Sauerstoffverbrauch als MDS-Patienten mit $1,63 \text{ pmol} / (\text{min} * \mu\text{g})$. Bezieht man den Sauerstoffverbrauch nur auf die Zellzahl, so verbrauchen die Zellen von MDS-Patienten paradoxerweise sogar mehr Sauerstoff als die Zellen der Kontrollen. Dieser Unterschied war statistisch aber nicht signifikant.

Bei der $\text{LEAK}_{\text{ROT+Suc}}$ -Atmung zeigten die Kontrollzellen ebenfalls einen höheren Sauerstoffverbrauch als die Zellen von MDS-Patienten, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war ($p = 0,054$). Bezogen auf die Zellzahl zeigten beide Gruppen praktisch eine identische LEAK-Atmung.

Der niedrigere Sauerstoffverbrauch mononukleärer Zellen von MDS-Patienten bei der ROUTINE- und der LEAK-Atmung in Bezug auf den Proteingehalt lässt sich am ehesten damit erklären, dass die Zellen von MDS-Patienten insgesamt mehr Eiweiß enthalten als die Zellen aus gesundem Knochenmark. Die photometrische Messung des Proteingehaltes beider Gruppen zeigte, dass die Proben der MDS-Patienten durchschnittlich einen höheren Proteingehalt haben als die Proben der Kontrollen,

wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war ($p = 0,25$; siehe Abbildung 3.3). Ein Grund für die Zunahme des Proteingehalts bei MDS-Zellen könnte ein defektes Proteasom sein. Proteasomen sind Zellorganellen, die für den Abbau von Proteinen zuständig sind. Bei einer Einschränkung ihrer Funktion würden Proteine weniger effizient abgebaut und könnten akkumulieren.

Ein anderer Grund für einen erhöhten Proteingehalt bei MDS-Zellen könnte mit megaloblastären Zellveränderungen in Zusammenhang stehen. Das Auftreten von megaloblastären Zellveränderungen ist eine häufige zytomorphologische Veränderung bei Patienten mit MDS (Germing U, *et al.* 2012). In Analogie zum Vitamin B12-Mangel und Folsäuremangel könnte eine Störung der DNA-Replikation zu einer Verzögerung der Zellteilung führen. Bei einer verminderten Zahl von Zellteilungen während der Ausreifung wäre zu erwarten, dass das Volumen der Zellen zunimmt und sich bei ungestörter Proteinsynthese dementsprechend der Proteingehalt der Zellen erhöht.

Im nächsten Schritt des SUI-Protokolls erfolgte in Kammer A des Oxygraphen die Zugabe von ADP und zusätzlich Pyruvat als Substrat für Komplex I. Es sollte die maximale Kapazität der oxidativen Phosphorylierung ($\text{OXPHOS}_{\text{GM+P}}$) gemessen werden. Die Ergebnisse zeigten nach der Zugabe von ADP einen Anstieg der Atemrate ($\text{OXPHOS}_{\text{GM}}$), nach Zugabe von Pyruvat ($\text{OXPHOS}_{\text{GM+P}}$) kam es jedoch nicht wie erwartet zu einem weiteren Anstieg der Atemrate, sondern zu deren Absinken. Dieser paradoxe Effekt der Hemmung der Atemrate durch Zugabe von Pyruvat zu Glutamat und Malat konnte mittlerweile ebenfalls bei respiratorischen Messungen der Skelettmuskulatur von Pferden gezeigt werden (Votion DM, *et al.* 2012). Die schnelle Zugabe des Pyruvat in der von uns verwendeten Konzentration führt zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung. Die maximale Kapazität der oxidativen Phosphorylierung in gekoppeltem Zustand konnte damit am ehesten in dem Schritt vor Zugabe des Pyruvat erreicht werden.

Das *SUIT*-Protokoll sieht als nächsten Schritt die Entkopplung der Atmungskette vor. Es wird dreimalig 2,1 μ l einer 200 mM TTFB-Lösung in die Messkammern des Oxygraphen titriert. Durch Zugabe des TTFB wäre eigentlich eine Steigerung der Atemrate zu erwarten gewesen, da aufgrund der Entkopplung der Protonengradient über der inneren mitochondrialen Membran fast vollständig aufgehoben wird und somit die volle Kapazität des Elektronen-Transport-Systems (ETS) erreicht wird, welche nicht mehr von der oxidativen Phosphorylierung limitiert wird. Bei der abschließenden Auswertung des Sauerstoffverbrauches zeigte sich bei allen Proben und in beiden Kammern des Oxygraphen schon nach der ersten Zugabe des TTFB ein Absinken der Atemrate (siehe Abbildung 3.2 und Abbildung 3.5) im Vergleich zur maximalen Kapazität der oxidativen Phosphorylierung unter Glutamat, Malat und ADP (für Kammer A: ETS_{GM}) bzw. unter Rotenon, Succinat und ADP (für Kammer B: $ETS_{Rot+Suc}$). Im Durchschnitt verringerte sich die Atemrate bezogen auf die Zellzahl um 33 % bei den Kontrollen und um 17% bei den MDS-Patienten. Bezogen auf den Proteingehalt verringerte sich die Atemrate um 38% bei den Kontrollen und um 33% bei den MDS-Patienten. Bei den nachfolgenden Zugaben des TTFP verringerte sich die Atemrate noch weiter. Das Absinken der Atemrate nach Zugabe des Entkopplers kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die in unserem Protokoll verwendete Konzentration des TTFB zu einer Hemmung der Atemrate führt. Diese paradoxe Situation wurde bereits in der Literatur beschrieben, wobei der genaue Mechanismus unklar bleibt (Steinlechner-Maran R, *et al.* 1996). Eine zweite Möglichkeit wäre, dass sich die Zellen in unseren Versuchen bereits vor Zugabe des Entkopplers in einem maximalen Zustand der Entkopplung z.B. durch Schädigung der inneren mitochondrialen Membran befanden und die Titration des TTFB somit keine Steigerung der Respiration auslösen konnte. Bei der Interpretation der Ergebnisse gehen wir nicht davon aus, dass es sich bei den von uns gemessenen Atemraten in entkoppeltem Zustand um die maximal möglichen Atemraten handelt. Eine Aussage über die maximale Funktion des Elektronen-Transport-Systems kann somit nicht getroffen werden.

Im letzten Schritt des *SUIT*-Protokolls erfolgte die Zugabe von TMPD als künstlicher Elektronendonator für die Cytochrom c-Oxidase (COX). Hierbei wird die maximale Kapazität des Komplex IV gemessen. Die Zugabe des Ascorbat hält TMPD in reduziertem Zustand und verhindert weitestgehend dessen Autooxidation. Die Atemrate zeigte eine deutliche Steigerung auf Maximalwerte nach Zugabe des TMPD und Ascorbat (siehe Abbildung 3.2 und Abbildung 3.5). Die Zellen der Kontrollen zeigten hierbei höhere Atemraten im Vergleich zu den Zellen der MDS-Patienten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen fand sich jedoch nicht. Bezogen auf die Zellzahl unterschied sich die Atemrate um 11% ($p = 0,47$) und bezogen auf den Proteingehalt um 42% ($p = 0,06$). Die Ergebnisse deuten auf eine hohe Reservekapazität der Cytochrom c-Oxidase hin, die bei möglichen Schäden von Atmungskettenkomplexen eine suffiziente Energiegewinnung gewährleisten könnte (Gnaiger E, *et al.* 1998 a). Unsere Ergebnisse deuten nicht auf einen funktionell relevanten Defekt des Komplex IV der Atmungskette hin. Die absoluten COX-Atemraten, die bei unseren Messungen ermittelt wurden, überschätzen wahrscheinlich die tatsächliche Kapazität der Cytochrom c-Oxidase, da wir bei unseren Versuchen keine Korrektur der Atemrate durch Autooxidation des TMPD durchgeführt haben. Die Zugabe des Ascorbat verhindert in diesem Zusammenhang lediglich die unkontrollierte Oxidation des TMPD und hält es in reduziertem Zustand. Insbesondere die Anwesenheit von Eisen führt, neben dem Sauerstoffverbrauch durch Zellatmung, zu einem chemischen Verbrauch von Sauerstoff durch Autooxidation, der berücksichtigt werden sollte (Gnaiger E, *et al.* 1998 a; Kuznetsov AV, *et al.* 2010).

Die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase bei MDS-Patienten wurde bereits in der Vergangenheit spektrophotometrisch von Aoki (1980) und Matthes, *et al.* (2006) gemessen. Die beiden Arbeitsgruppen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So konnte Aoki eine verminderte Aktivität der Cytochrom c-Oxidase bei 69 Patienten mit MDS zeigen (Aoki Y 1980). Matthes, *et al.* hingegen fanden bei fünf Patienten

mit MDS eine unbeeinträchtigte Cytochrom c-Oxidase-Aktivität (Matthes T, *et al.* 2006). Aufgrund der differierenden Ergebnisse gehen wir davon aus, dass die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase als alleiniger Faktor in der Pathophysiologie von MDS keine entscheidende Rolle spielt.

In Zusammenschau zeigen unsere Messergebnisse keine signifikanten Unterschiede des Sauerstoffverbrauches von mononukleären Knochenmarkzellen zwischen MDS-Patienten und Kontrollen, wenn der Sauerstoffverbrauch auf die Zellzahl bezogen wird (Abbildung 3.1 und 3.4). Nur wenn man den Sauerstoffverbrauch auf den Proteingehalt bezieht, zeigt sich ein signifikant niedrigerer Verbrauch von Sauerstoff bei MDS-Patienten in der *ROUTINE*-Atmung und in der *LEAK*-Atmung (Abbildung 3.7). Ein valider Unterschied im Atmungsverhalten unserer beiden Vergleichsgruppen lässt sich nicht eindeutig ableiten. Die graphische Darstellung der einzelnen Atemraten in unterschiedlichen Kopplungszuständen zeigt eine große Varianz zwischen den Proben (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.4). Die Zeit zwischen Entnahme der Zellen bis zum Beginn der Respirometrie (durchschnittlich 190 Minuten) und der Transport der Zellen in PBS-Puffer sollte keine negativen Auswirkungen auf die Atmungsaktivität der Mitochondrien haben. So konnte bereits für die Zellatmung von Muskelfasern gezeigt werden, dass eine Lagerung von bis zu 36 Stunden keinen relevanten Einfluss auf die Atmungsaktivität von Mitochondrien in Muskelfasern hat (Kraft A, *et al.* 1995). Ob sich diese Ergebnisse auch auf mononukleäre Zellen des hämatopoetischen Systems übertragen lassen, ist nicht geklärt.

Ein häufig verwendeter Parameter zur Quantifizierung der Funktion von Mitochondrien unter experimentellen Bedingungen ist die *Respiratory Control Ratio* (RCR). Die RCR wird aus OXPHOS-Atemrate und LEAK-Atemrate berechnet ($RCR = OXPHOS / LEAK$). Generell zeigen hohe RCR-Werte eine gute mitochondriale Funktion an und niedrige Werte können als Hinweis auf eine

Dysfunktion gewertet werden (Brand MD, Nicholls DG 2011). Die RCR-Werte in unseren Versuchen (Abbildung 3.6) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen MDS-Patienten und Kontrollen, wobei die RCR von MDS-Patienten unter Stimulation mit Succinat (Komplex II Substrat) deutlich höher lag als alle anderen RCR-Werte. Wird die Funktion der mitochondrialen Atmungskette als *Oxphos Coupling Efficiency* angegeben (Abbildung 3.7), ist der Unterschied zwischen MDS-Patienten und Kontrollen unter Stimulation mit Komplex II-Substraten signifikant ($p = 0,015$). Das deutet darauf hin, dass die oxidative Phosphorylierung von Mitochondrien der MDS-Patienten effizienter als bei den Kontrollen ist und die Zellen weniger endogen entkoppeln. Unsere Ergebnisse zeigen eine höhere RCR und eine höhere *Oxphos Coupling Efficiency* bei MDS-Patienten im Vergleich mit Kontrollen unter Stimulation von Komplex II-Substrat (Succinat). Dies lässt darauf schließen, dass bei MDS-Patienten eine veränderte Aktivität von Komplex II der mitochondrialen Atmungskette besteht. Auf den ersten Blick erscheint es schwierig, eine effizientere Kopplung der mitochondrialen Atmungskette mit einem Proteinkomplex zu erklären, der aktiv keine Protonen über die innere mitochondriale Membran transportieren kann. Allerdings könnte eine Interaktion des Komplex II mit dem *uncoupling protein 4* (UCP4) eine veränderte Aktivität des Komplex II und eine Änderung des Kopplungszustandes erklären. So konnten Ho, *et al.* 2012 zeigen, dass eine Überexpression von UCP4 in Neuroblastom-Zellen (*SH-SY5Y neuroblastoma cells*) die ATP-Synthese durch spezifische Interaktion mit Komplex II der mitochondrialen Atmungskette erhöht. Die Untersuchungen von Ho, *et al.* zeigen keine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials nach Überexpression von UCP4. Durch die Überexpression von UCP4 und dessen Interaktion mit Komplex II kommt es wahrscheinlich zu einer lokalen Erhöhung der Protonenkonzentration am Komplex II. Hierdurch kann die Aktivität des Komplex II durch Reduktion von Ubichinon über die Häm-Gruppe des Komplex II erhöht werden (Ho PW, *et al.* 2012). Wir interpretieren unsere Beobachtung, dass MDS-Zellen eine effizientere Kopplung im Vergleich mit Kontrollen zeigen, damit, dass

möglicherweise eine veränderte Expression bzw. Aktivität von UCP4 besteht, die durch Interaktion mit Komplex II zu einer gesteigerten Aktivität führt. Ob mononukleäre Knochenmarkszellen von MDS-Patienten UCP4 überexprimieren, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Eine erhöhte Aktivität des Komplex II bei MDS-Patienten könnte darauf hindeuten, dass hier eine Reservekapazität der Atmungskette aktiviert wird, um erhöhten ATP-Bedarf im Rahmen der pausenlosen klonalen Proliferation der hämatopoetischen Zellen zu decken. Proliferativer Stress geht bei hämatopoetischen Stammzellen mit höherer metabolischer Aktivität der Mitochondrien einher. So konnten Walter *et al.* 2015 zeigen, dass hämatopoetische Stammzellen von Mäusen durch Stress aufgrund von chronischem Blutverlust oder Infektionen aus einem ruhenden, inaktiven Status in einen aktiven, proliferierenden Status übergehen. Die Aktivierung der Stammzellen führte zu einer höheren metabolischen Aktivität der Mitochondrien mit höherem mitochondrialen Membranpotential (Walter D, *et al.* 2015). Ein höheres mitochondriales Membranpotential kann durch eine effizientere oxidative Phosphorylierung erreicht werden. Allerdings ist ein höheres mitochondriales Membranpotential gleichzeitig mit einer vermehrten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert. Bei dem Zusammenhang von ROS-Entstehung und mitochondrialem Membranpotential geht man davon aus, dass ein erhöhtes mitochondriales Membranpotential den Elektronenfluss entlang der Atmungskette verlangsamt; dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass einzelne Elektronen mit Sauerstoff reagieren und ROS (Dioxid(1-)) entstehen (Holmström KM, Finkel T 2014). Somit könnte die bei MDS-Patienten beobachtete effizientere oxidative Phosphorylierung unter Stimulation mit Komplex II-Substrat durch vermehrte ROS-Produktion zu verstärkten Schäden der DNA führen.

Für die Messungen mit Komplex I-Substraten waren die Werte sowohl für die RCR als auch für die *Oxphos Coupling Efficiency* bei MDS-Patienten und Kontrollen nahezu gleich.

Die ROUTINE-Atemrate ist die Atemrate, die am ehesten der Situation *in vivo* entspricht, da sie an intakten Zellen gemessen wird. Im Gegensatz zu Bowen und Peddie (2002) fanden wir bei unseren Messungen keine signifikanten Unterschiede in der ROUTINE-Atemrate zwischen MDS-Patienten und Kontrollen. Die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung in diesem Zustand wird als *Routine Coupling Efficiency* berechnet (Abbildung 3.8). Bowen und Peddie berechneten keine *Routine Coupling Efficiency*, da sie keine LEAK-Atemrate bestimmten.

Insgesamt kann ein Defekt der mitochondrialen Atmungskette in den Knochenmarkzellen von MDS-Patienten, der zu einer relevanten funktionellen Einschränkung der Atemarbeit führt, aus unseren Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Die Ergebnisse von Bowen und Peddie (2002), die einen interessanten Anstoß lieferten, um mitochondriale Dysfunktion als einen Mechanismus zu identifizieren, der bei der Pathogenese myelodysplastischer Syndrome eine Rolle spielt, konnten somit anhand einer wesentlich differenzierteren und aussagekräftigeren Messmethode nicht bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte durch Messung des Sauerstoffverbrauches von mononukleären Knochenmarkzellen bei MDS-Patienten und Kontrollpersonen dem Verdacht nachgegangen werden, dass eine Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette an der Pathogenese von MDS beteiligt ist. Bei der Messung des Sauerstoffverbrauches durch hochauflösende Respirometrie mit selektiver Untersuchung einzelner Atmungskettenabschnitte zeigten die Zellen von MDS-Patienten nur dann einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch bei der ROUTINE- und der LEAK-Atmung, wenn diese in Bezug auf den Proteingehalt berechnet wurde. Bezog man den Sauerstoffverbrauch auf die Zellzahl, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Der niedrigere Sauerstoffverbrauch in Bezug auf den Proteingehalt lässt sich am ehesten damit erklären, dass die Zellen von MDS-Patienten einen höheren Eiweißgehalt aufwiesen als die Zellen der Kontrollen.

Wenn die Funktion der mitochondrialen Atmungskette als *Oxphos Coupling Efficiency* ausgewertet wurde, fand sich zwischen MDS-Patienten und Kontrollen nur unter Stimulation mit Komplex II-Substraten ein signifikanter Unterschied, mit gleichzeitig effizienterer Kopplung bei MDS. Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass eine verstärkte Expression bzw. Aktivität von UCP4 (*uncoupling proteine 4*), durch Interaktion mit Komplex II dessen Aktivität steigern kann. Die bei MDS-Patienten beobachtete effizientere oxidative Phosphorylierung unter Stimulation mit Komplex II-Substrat könnte wegen der damit verbundenen Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials durch gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu vermehrten oxidativen Schäden der DNA führen.

Insgesamt kann ein Defekt der mitochondrialen Atmungskette in den Knochenmarkzellen von MDS-Patienten, der zu einer relevanten funktionellen Einschränkung der Atemarbeit führt, aus unseren Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Die Ergebnisse von Bowen und Peddie (2002), die einen verminderten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in mononukleären Knochenmarkzellen von MDS-Patienten beobachteten und damit einen interessanten Anstoß lieferten, um

mitochondriale Dysfunktion als einen Mechanismus zu identifizieren, der bei der Pathogenese myelodysplastischer Syndrome eine Rolle spielt, konnten somit anhand einer wesentlich differenzierteren und aussagekräftigeren Messmethode nicht bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981 Apr 9; 290(5806):457-65.

Aoki Y

Multiple Enzymatic Defects in Mitochondria in Hematological Cells of Patients with Primary Sideroblastic Anemia
J Clin Invest. 1980 July; 66(1): 43–49.

Beechey RB

The uncoupling of respiratory-chain phosphorylation by 4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazole.
Biochemical Journal. 1966; 98(1):284-289.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C
Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.
Br J Haematol. 1982 Jun; 51(2):189-99.

Benninghoff A, Drenckhahn D (Hg.)

In: Anatomie (Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie)
2008, 17. Auflage Band 1, Elsevier, München

Bowen D, Peddie C

Mitochondrial oxygen consumption and ineffective haematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes.
Br J Haematol. 2002 Jul; 118(1):345-6.

Bowen D, Wang L, Frew M, Kerr R, Groves M

Antioxidant enzyme expression in myelodysplastic and acute myeloid leukemia bone marrow: further evidence of a pathogenetic role for oxidative stress?

Haematologica. 2003 Sep; 88(9):1070-2.

Bottomley SS

Sideroblastic anemias. In: Lee GR, Foerster J, Lukens JN, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers G, (Hg.) Wintrobe's Clinical Hematology. 1998, 10th ed. Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1022-45.

Boyer PD

The ATP synthase a splendid molecular machine.

Annu Rev Biochem. 1997; 66:717-49.

Brand MD, Nicholls DG

Assessing mitochondrial dysfunction in cells.

Biochem J. 2011 Apr 15; 435(2):297-312.

Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW, Hellström-Lindberg E

Myelodysplastic syndromes / neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hg.)

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.

Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE

Bovine complex I is a complex of 45 different subunits.

J Biol Chem. 2006 Oct 27; 281(43):32724-7.

Cazzola M, Invernizzi R

Ring sideroblasts and sideroblastic anemias

Haematologica Jun 2011, 96 (6) 789-792

Cecchini G

Function and structure of complex II of the respiratory chain.

Annu Rev Biochem. 2003;72:77-109.

Chance B, Williams GR

Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state.

J Biol Chem. 1955 Nov; 217(1):409-27.

Chen TH, Walshauer M, Kambal A, Raju G, Walter MJ

Reduced HSPA9B expression, a 5q31.2 candidate gene, in primary human CD34+ cells recapitulates features of ineffective hematopoiesis observed in MDS.

Blood 2007 (ASH Annual Meeting Abstracts), 110, 116.

Craven SE, French D, Ye W, de Sauvage F, Rosenthal A

Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome.

Blood. 2005 May 1; 105(9):3528-34.

Crofts AR, Berry EA

Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria.

Curr Opin Struct Biol. 1998 Aug; 8(4):501-9.

Fawcett DW (Hg.)

Chapter 7: Mitochondria. In: The cell (second edition).

1981 Philadelphia: W.B. Saunders Co.

Fracchiolla NS, Bamonti Catena F, Novembrino C, Ippolito S, Maisonneuve P, Cortelezzi A

Possible association between reactive oxygen metabolites and karyotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes.

Haematologica. 2003 May; 88(5):594-7.

Freeman KB, Haldar D

The inhibition of mammalian mitochondrial NADH oxidation by chloramphenicol and its isomers and analogues.

Can J Biochem. 1968 Sep; 46(9):1003-8.

Frezza, C, Cipolat S, Scorrano L

Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts.

Nat. Protoc. 2007; 2, 287–295.

Gattermann N

Iron rusting in the mitochondria?

Blood. 2016 Oct 13; 128(15):1907-1908.

Gattermann N

Chapter 6: The role of mitochondria in MDS. In: Steensma DP (Hg.), Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management.

2008; 2nd Ed. London, United Kingdom: Informa Health Care

Gattermann N

From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes.

Leuk Res. 2000 Feb; 24(2):141-51.

Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C

Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients.

Leuk Res. 2000 Dec; 24(12):983-92.

Germing U, Strupp C, Giagounidis A, Haas R, Gattermann N, Starke C, Aul C

Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes.

Leuk Res. 2012 Jun; 36(6):727-34.

Ghoti H, Amer J, Winder A, Rachmilewitz E, Fibach E

Oxidative stress in red blood cells, platelets and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndrome.

Eur J Haematol. 2007 Dec; 79(6):463-7. Epub 2007 Nov 1.

Gnaiger E

O2k Quality Control 1: Polarographic oxygen sensors and accuracy of calibration.

Mitochondrial Physiology Network (2016) 06.03(15):1-8

Gnaiger E

Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis.

4th ed. Mitochondr Physiol Network 19.12. (2014) OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck:80 pp.

Gnaiger E (a), Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R

Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase.

J Exp Biol. 1998 Apr;201(Pt 8):1129-39.

Gnaiger E (b), Kuznetsov A, Lassnig B, Fuchsa A, Reck M, Renner K, Stadlmann S, Rieger G, Margreiter R

High-resolution respirometry. Optimum permeabilization of the cell membrane by digitonin.

In BioThermoKinetics in the Post Genomic Era; 1998 (Larsson C, Pahlman I-L, Gustafsson L, Hg.) Chalmers Reproservice, Göteborg:89-95.

Grasso JA, Myers TJ, Hines JD, Sullivan AL

Energy-dispersive X-ray analysis of the mitochondria of sideroblastic anaemia.

Br J Haematol. 1980 Sep; 46(1):57-72.

Greenberg PL

Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes:

implications for disease natural history and treatment.

Leuk Res. 1998 Dec; 22(12):1123-36.

Haferlach T (a) (Hg.), Bacher U, Gattermann N, Giagounidis A

Myelodysplastische Syndrome von A bis Z

2014, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag; Stuttgart / New York

Haferlach T (b), Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S

Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes.

Leukemia. 2014 Feb; 28(2):241-7.

Holmström KM, Finkel T

Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Jun; 15(6):411-21.

Houwerzijl EJ, Pol HW, Blom NR, van der Want JJ, de Wolf JT, Vellenga E
Erythroid Precursors from Patients with Low-Risk Myelodysplasia Demonstrate
Ultrastructural Features of Autophagy.
Blood Nov 2007, 110 (11) 2444.

Jacobs A, Bowen DT

Pathogenesis and evolution of refractory anemia. In: Mufti GJ, Galton DAG (Hg.)
The Myelodysplastic syndromes.
Edinburgh: Churchill Livingstone; 1992:33-53.

Janssen JW, Buschle M, Layton M, Drexler HG, Lyons J, van den Berghe H,
Heimpel H, Kubanek B, Kleihauer E, Mufti GJ, *et al.*

Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell
origin
Blood. 1989 Jan; 73(1):248-54.

Karp G (Hg.)

Chapter 9: Mitochondrial Structure and Function. In: Cell Biology, 2013, 7th Edition
International Student Version

Koeffler HP, Golde DW

Human preleukemia.
Ann Intern Med. 1980 Aug; 93(2):347-53.

Kraft A, Wersebe O, Neudecker S, Hein W, Haunschild M, Skladal D, Sperl W,
Gnaiger E, Margreiter M, Zierz S and Gellerich FN

Long term stability of mitochondrial functions in human skeletal muscle
fibers during cold storage.

1st Colloquium on mitochondria and myopathies in Halle/Saale. J Mol Med 1995 73:
B45

Krebs HA, Gascoyne T, Notton BM

Generation of extramitochondrial reducing power in gluconeogenesis.

Biochem J. 1967 Jan; 102(1):275-82.

Kunz WS, Kudin A, Vielhaber S, Elger CE, Attardi G, Villani G

Flux control of cytochrome *c* oxidase in human skeletal muscle.

J Biol Chem. 2000; 275, 27741–27745.

Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS

Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells.

Nat Protoc. 2008; 3(6):965-76.

Kuznetsov AV, Gnaiger E

Oxygraph assay of cytochrome *c* oxidase activity: chemical background correction.

Mitochondr Physiol Network (2010) 06.06(07):1-4.

Layton DM, Mufti GJ

Myelodysplastic syndromes: their history, evolution and relation to acute myeloid leukaemia.

Blut. 1986 Dec; 53(6):423-36.

Löffler G, Petrides PE (Hg.)

Biochemie und Pathobiochemie

2003, 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin / Heidelberg / New York

Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage JF, Walker JE

F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase.

Biochem J. 1993 November 1; 295 (Pt 3): 799–806.

Maldonado JE, Maigne J, Lecoq D

Comparative electron-microscopic study of the erythrocytic line in refractory anemia (preleukemia) and myelomonocytic leukemia.

Nouv Rev Fr Hematol Blood Cells. 1976; 17(1-2):167-85.

Mannella CA, Colombini M

Evidence that the crystalline arrays in the outer membrane of Neurospora mitochondria are composed of the voltage-dependent channel protein.

Biochim Biophys Acta. 1984 Jul 25; 774(2):206-14.

Matthes TW, Meyer G, Samii K, Beris P

Increased apoptosis in acquired sideroblastic anaemia

British Journal of Haematology, 2000; 111, 843-852.

Matthes T, Rustin P, Trachsel H, Darbellay R, Costaridou S, Xaidara A, Rideau A, Beris P

Different pathophysiological mechanisms of intramitochondrial iron accumulation in acquired and congenital sideroblastic anemia caused by mitochondrial DNA deletion.

Eur J Haematol. 2006 Aug; 77(2):169-74.

Mecucci C

Molecular features of primary MDS with cytogenetic changes.

Leuk Res. 1998 Apr; 22(4):293-302.

Milner, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y

Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function.

J Cell. Biol. 2000; 150, 1283–1298.

Mitchell P

Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.

Nature. 1961 Jul 8; 191:144-8.

Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, Cazzola M, Fenaux P, Germing U, Hellström-Lindberg E, Jinnai I, Manabe A, Matsuda A, Niemeyer CM, Sanz G, Tomonaga M, Vallespi T, Yoshimi A; International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome.

Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts.

Haematologica. 2008 Nov;93(11):1712-7.

Nachtkamp K, Stark R, Strupp C, Kündgen A, Giagounidis A, Aul C, Hildebrandt B, Haas R, Gattermann N, Germing U

Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes.

Ann Hematol. 2016 May;95(6):937-44.

Palade GE

In: Enzymes: Units of Biological Structure and Function (Gaebler OH, Hg.);

Academic Press: New York 1956 p. 185-215

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A, Shlien A, Groves MJ, Forbes SA, Raine K, Hinton J, Mudie LJ, McLaren S, Hardy C, Latimer C, Della Porta MG, O'Meara S, Ambaglio I, Galli A, Butler AP, Walldin G, Teague JW, Quek L, Sternberg A, Gambacorti-Passerini C, Cross NC, Green AR, Boultonwood J, Vyas P, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Cazzola M, Stratton MR, Campbell PJ
Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes.
Blood. 2013 Nov 21; 122(22):3616-27.

Peddie CM

Oxidative DNA damage in CD34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumour necrosis factor-alpha concentration.
Br J Haematol. 1997 Dec; 99(3):625-31.

Porra RJ, Jones OT

Studies on ferrochelatase. 1. Assay and properties of ferrochelatase from a pig-liver mitochondrial extract.
Biochem J. 1963 Apr; 87:181-92.

Ravanel P, Tissut M, Douce R

Effects of Rotenoids on Isolated Plant Mitochondria.
Plant Physiol. 1984 75, 414-420.

Raza A, Gezer S, Mundle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou A, *et al.*

Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes.

Blood. 1995 Jul 1; 86(1):268-76.

Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F, Kunz WS

Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo.

Mol. Cell. Biochem. 1998; 184, 81–100.

Sjöstrand FS

Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes.

Nature. 1953 Jan 3;171(4340):30-2.

Steensma DP

Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment

Mayo Clin Proc. July 2015; 90(7):969-983

Steinlechner-Maran R, Eberl T, Kunc M, Margreiter R, Gnaiger E

Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. Am J Physiol. 1996 Dec; 271(6 Pt 1):C2053-61.

Steinlechner-Maran R, Eberl T, Kunc M, Schröcksnadel H, Margreiter R, Gnaiger E

Respiratory defect as an early event in preservation-reoxygenation injury of endothelial cells.

Transplantation. 1997 Jan 15; 63(1):136-42.

Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z

Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II.
Cell. 2005 Jul 1; 121(7):1043-57.

Tehranchi R, Invernizzi R, Grandien A, Zhivotovsky B, Fadeel B, Forsblom AM, Travaglino E, Samuelsson J, Hast R, Nilsson L, Cazzola M, Wibom R, Hellström-Lindberg E

Aberrant mitochondrial iron distribution and maturation arrest characterize early erythroid precursors in low-risk myelodysplastic syndromes.
Blood 2005; 106: 247–253.

Thompson JE, Conlon JP, Yang X, Sanchez PV, Carroll M

Enhanced growth of myelodysplastic colonies in hypoxic conditions.
Experimental Hematology 35 2007 21–31.

Traweek ST, Slovak ML, Nademanee AP, Brynes RK, Niland JC, Forman SJ

Clonal karyotypic hematopoietic cell abnormalities occurring after autologous bone marrow transplantation for Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma.
Blood. 1994 Aug 1; 84(3):957-63.

Vercesi AE, Bernardes CF, Hoffmann ME, Gadelha FR, Docampo R

Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ.
J Biol Chem. 1991 Aug 5; 266(22):14431-4.

Villani G, Greco M, Papa S, Attardi G

Low reserve of cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types.
J. Biol. Chem. 1998; 273, 31829–31836.

Votion DM, Gnaiger E, Lemieux H, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D

Physical fitness and mitochondrial respiratory capacity in horse skeletal muscle.
PLoS One. 2012; 7(4):e34890

Walter D, Lier A, Geiselhart A, Thalheimer FB, Huntscha S, Sobotta MC, Moehrle B, Brocks D, Bayindir I, Kaschutnig P, Muedder K, Klein C, Jauch A, Schroeder T, Geiger H, Dick TP, Holland-Letz T, Schmezer P, Lane SW, Rieger MA, Essers MA, Williams DA, Trumpp A, Milsom MD

Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells.

Nature. 2015 Apr 23; 520(7548):549-52.

Walter MJ, Shen D, Shao J, Ding L, White BS, Kandoth C, Miller CA, Niu B, McLellan MD, Dees ND, Fulton R, Elliot K, Heath S, Grillot M, Westervelt P, Link DC, DiPersio JF, Mardis E, Ley TJ, Wilson RK, Graubert TA

Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes.

Leukemia. 2013 Jun; 27(6):1275-82.

West PA, Daniel RM, Knowles CJ, Lee JV

Tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) oxidase activity and cytochrome distribution in the genus *Vibrio*.

FEMS Microbiology Letters, 1978, 4: 339–342.

Wiernik PH, Goldman JM, Dutcher JP, Kyle RA (Hg.)

In: Neoplastic Diseases of the Blood

University Press, Cambridge 2003, Fourth edition, Cambridge, UK, 1196 pp

Ho PW, Ho JW, Tse HM, So DH, Yiu DC, Liu HF, Chan KH, Kung MH, Ramsden DB, Ho SL

Uncoupling protein-4 (UCP4) increases ATP supply by interacting with mitochondrial Complex II in neuroblastoma cells.

PLoS One. 2012; 7(2): e32810.

Wulfert M, Küpper AC, Tapprich C, Bottomley SS, Bowen D, Germing U, Haas R, Gattermann N

Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes.

Exp Hematol. 2008 May; 36(5):577-86.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

12.12.2016, Dominik Wulf

Unterschrift