

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. S. Zierz)

**Langzeitstabilität der Mitochondrienfunktion permeabilisierter  
Muskelfasern in der Diagnostik mitochondrialer  
Enzephalomyopathien**

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

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

von Andrea Kraft  
geboren am 18.09.1973 in Leipzig

Betreuer: PD Dr. F.N. Gellerich

Gutachter: 1. PD Dr. F.N. Gellerich  
2. Prof. Dr. C.-W. Wallesch  
3. Prof. Dr. J. Holtz

verteidigt am 05.10.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007291**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007291>]

## **Referat und bibliographische Beschreibung**

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Weiterentwicklung und Optimierung der Skinned fiber-Technik in Verbindung mit der hochauflösenden Respirometrie zur funktionellen Untersuchung von Mitochondrien bei der Diagnostik mitochondrialer Enzephalomyopathien.

Einen Schwerpunkt bildete dabei die Untersuchung der Langzeitstabilität der Mitochondrienfunktion in Skelettmuskelfasern. In 13 Lagerungsexperimenten mit Muskelproben von Patienten ohne mitochondriale Erkrankungen wurde gezeigt, dass die Mitochondrienfunktion bei der Veratmung von Komplex I- und II-abhängigen Substraten bis zu einer Lagerungszeit von 36 Stunden stabil blieb. Lagerung über 36 Stunden hinaus führte zu verschlechterter Mitochondrienfunktion. Die maximalen und die Atraktylat-gehemmten Atmungsraten nahmen bis zu 36 Stunden Lagerungszeit leicht zu. Durch Optimierung der Lagerungsbedingungen (ununterbrochene Kühlkette) ließ sich der Anstieg der Atraktylat-gehemmten Atmung vermindern. Der Zusatz von Proteinase-Inhibitoren und einem Antibiotikum zum Storagepuffer erbrachte keine Verbesserung der Konservierung der Mitochondrienfunktion. Bei einer Lagerung des Muskelmaterials im bereits permeabilisierten Zustand war die zeitliche Stabilität der Mitochondrien nicht immer gegeben, weshalb das Biopsiematerial erst unmittelbar vor der respirometrischen Untersuchung permeabilisiert werden sollte.

In dieser Arbeit wurde die auf die Succinatatmung bezogene Pyruvatatmung als ein von der Mitochondrienmenge unabhängiger Parameter neu etabliert.

Es sollte weiter geprüft werden, ob der Versand von Biopsieproben per Kurierdienst aus anderen Kliniken möglich ist. Hierzu wurde zugesandtes Muskelmaterial von 41 Patienten mit Verdacht auf eine mitochondriale Erkrankung untersucht. Es ließ sich zeigen, dass bei Gewährleistung der erforderlichen Transportbedingungen auch nach einer Transportzeit von 24 Stunden aussagekräftige respirometrische Messungen durchgeführt werden können. Die Anwendbarkeit und der Stellenwert der oxygraphischen Methode bei der Diagnostik von mitochondrialen Enzephalomyopathien wird dadurch deutlich erweitert.

Kraft, Andrea: Langzeitstabilität der Mitochondrienfunktion permeabilisierter Muskelfasern in der Diagnostik mitochondrialer Enzephalomyopathien.  
Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Mitochondriale Enzephalomyopathien .....	1
1.1.1	Definition und Begriffsentwicklung .....	1
1.1.2	Wichtige Krankheitsbilder und Syndrome.....	2
1.2	Entwicklung des Konzeptes der mitochondrialen Medizin .....	3
1.3	Biochemische Grundlagen .....	4
1.3.1	Struktur und Funktion der Mitochondrien .....	4
1.3.2	Die oxidative Phosphorylierung.....	6
1.4	Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen .....	9
1.5	Skinned fiber-Technik.....	12
<b>2</b>	<b>Zielstellung der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.1	Chemikalien.....	15
3.2	Puffer und Pufferzusätze, Medien.....	15
3.3	Messgeräte.....	16
3.4	Aufbau des Oxygraphen - Prinzip der Sauerstoffmessung .....	16
3.5	Probengewinnung.....	17
3.6	Aufarbeitung der Proben .....	18
3.6.1	Präparation des Muskelmaterial.....	18
3.6.2	Permeabilisieren der Muskelfasern .....	18
3.6.3	Waschen der permeabilisierten Muskelfasern.....	18
3.6.4	Bestimmung des Feuchtgewichtes der Muskelproben .....	19
3.7	Respirometrische Messung .....	19
3.8	Funktionsparameter.....	21
3.8.1	Aktive Atmung.....	21
3.8.2	Succinat-bezogene Pyruvatatmung (SRPR).....	21
3.8.3	Citratsynthase-normierte Pyruvatatmung.....	21
3.8.4	Atraktylat-insensitive Atmung .....	21
3.8.5	Antimycin-resistente Atmung .....	22

3.8.6	Leak-Atmung.....	22
3.8.7	Respiratorischer Kontrollquotient.....	22
3.9	Lagerung der Muskelfasern im Storagepuffer.....	23
3.10	Lagerung permeabilisierter Muskelfasern in Storagepuffer.....	23
3.11	Statistische Verfahren... ..	23
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
4.1	Zeitliche Stabilität der funktionellen Eigenschaften von Mitochondrien .....	24
4.1.1	Einfluss der Lagerungszeit auf die Pyruvatatmung.....	24
4.1.2	Einfluss der Lagerungszeit auf die Succinatatmung .....	28
4.1.3	Einfluss der Lagerungszeit auf die Glutamatatmung .....	30
4.1.4	Einfluss der Lagerungszeit auf die Palmitoylcarnitinatmung .....	32
4.1.5	Einfluss der Lagerungszeit auf die Octanoylcarnitinatmung .....	33
4.1.6	Multiple Substrat-Inhibitor-Titration .....	35
4.1.7	Pyruvat-abhängige aktive Atmung unter dem Aspekt des Biopsieversandes ..37	
4.2	Stabilität der Mitochondrienfunktion in zugesandten Biopsien.....	38
4.2.1	Zugesandte Biopsien ohne respirometrische Auffälligkeiten .....	39
4.2.2	Zugesandte Biopsien mit respirometrischen Auffälligkeiten.....	39
4.3	Optimierung der Messmethode .....	43
4.3.1	Kühlung des gelagerten Muskelmaterials .....	43
4.3.2	Konservierung der Mitochondrienfunktion mit Storagepufferzusätzen .....	44
4.3.3	Lagerung des Muskelmaterials im permeabilisierten Zustand.....	45
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
5.1	Detektion mitochondrialer Defekte.....	48
5.2	Stabilität der Mitochondrienfunktion in Muskelfasern.....	50
5.3	Optimierung und Weiterentwicklung der Skinned fiber-Technik .....	58
5.4	Untersuchung von zugesandten Biopsien .....	60
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>73</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

AdN	Adeninnukleotid
ADP	Adenosindiphosphat
ADP <sub>Diff</sub>	Differenz zwischen ADP <sub>Start</sub> und ADP <sub>Ende</sub>
ADP <sub>Ende</sub>	State 3-Atmung nach 10 Minuten
ADP <sub>Start</sub>	State 3-Atmung kurz nach ADP-Zugabe
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CK	Kreatinkinase
COX	Cytochrom-c-Oxidase
Co Q	Coenzym Q
CR	Kreatin
CrP	Creatinphosphat
CS	Citratsynthase
Cyt c	Cytochrom c
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FG	Feuchtgewicht
H <sup>+</sup>	Protonen
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
PHDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PTP	Permeability-Transition-Pore
RSA	Rinderserumalbumin
RCI	Respiratorischer Kontrollkoeffizient
SD	Standardabweichung
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SRPR	Succinat Related Pryruvat Respiration

# 1 Einleitung

## 1.1 Mitochondriale Enzephalomyopathien

### 1.1.1 Definition und Begriffsentwicklung

Die Entwicklung des Konzeptes der Mitochondriopathien begann im Jahre 1959 mit der Beschreibung der Erkrankung einer jungen Frau mit einer milden muskulären Schwäche und einem enormen, nicht-thyroidal bedingten Hypermetabolismus durch Ernster und Luft (Ernster et al. 1959; Luft et al. 1962). Die damals durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass bei intakter Atmungskette die Kopplung des Elektronentransportes an die Bildung von ATP vermindert war. In den sechziger Jahren wurden bei Patienten mit einer chronisch externen Ophthalmoplegie erstmals histologische Veränderungen festgestellt, die als Ragged-red-Fasern bezeichnet wurden (Engel 1963; Olson et al. 1972) und die elektronenoptisch bald als Akkumulation von alterierten Mitochondrien identifiziert wurden. In der Folgezeit stellte sich heraus, dass bei einer Vielzahl anderer Krankheitsbilder unterschiedliche strukturelle Veränderungen der Mitochondrien nachweisbar sind. Mit der Entwicklung sensitiverer Methoden wurden Anfang der siebziger Jahre Defekte der Atmungskette und des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (Spiro et al. 1970; van Biervliet et al. 1977; Willems et al. 1977) sowie Störungen der Carnitin-Palmitoyl-Transferase und des Gehaltes an Carnitin im Muskel (DiMauro et al. 1973; Engel et al. 1973) entdeckt. Bis in die frühen achtziger Jahre wurden mehr als 20 Defekte der Atmungskette sowie zahlreiche andere Enzymdefekte, wie z.B. der Cytochrom-c-Oxidase-Mangel, identifiziert. Shapira et al. prägten 1977 für eine Gruppe neuromuskulärer Syndrome, die durch strukturell oder funktionell alterierte Mitochondrien im Muskel oder Gehirn gekennzeichnet sind, den Begriff „mitochondriale Enzephalomyopathien“ (Shapira et al. 1977). Heute versteht man unter den mitochondrialen Enzephalomyopathien eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die auf einem Defekt der oxydativen Phosphorylierung beruhen. Bei den klinisch, biochemisch und genetisch heterogenen Syndromen stehen Symptome des Zentralnervensystems und des Skelettmuskels im Vordergrund, es können aber auch andere Gewebe im Sinne einer Multisystemerkrankung betroffen sein. Mitochondrienerkrankungen, die andere Stoffwechselwege betreffen, wie z.B. die Fettsäureoxidation, gehören heute im engeren Sinne nicht zu den mitochondrialen Enzephalomyopathien.

### 1.1.2 Wichtige Krankheitsbilder und Syndrome

Eine konsistente Klassifikation der mitochondrialen Enzephalomyopathien ist bisher nicht gelungen. Speziellen biochemischen Defekten lassen sich keine distinkten Krankheitsbilder zuordnen. Andererseits können gleichen klinischen Symptomen unterschiedliche biochemische Defekte der Atmungskette und unterschiedliche Mutationen zugrunde liegen.

Molekulargenetisch können mitochondriale Enzephalomyopathien sowohl auf Defekten des mitochondrialen als auch des nukleären Genoms basieren. Je nach zugrundeliegender Mutation wird entweder ein mitochondrialer, d.h. maternaler, oder autosomaler (rezessiver oder dominanter) Vererbungsmodus beobachtet.

Erkrankungsbeginn ist meist das Kindes- und Jugendalter, aber es gibt auch Fälle mit einer Erstmanifestation im Erwachsenenalter. Phänotypisch steht letztlich bei allen genetischen Defekten des oxidativen Stoffwechsels eine Störung der Energiebereitstellung im Vordergrund (Gellerich et al. 2002), die sich vor allem auf Gewebe mit hohem Energiebedarf, wie Skelettmuskel, zentrales Nervensystem, Herz, Ohr, Auge, Niere und Endokrinium, auswirkt. Die variable syndromartige Kombination der verschiedenen Symptome verschiedener betroffener Organe bedingt die Ausdrucksvielfalt der mitochondrialen Enzephalomyopathien. Charakteristische Symptome mitochondrialer Enzephalomyopathien sind eine chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO) mit Ptosis und Augenbewegungsstörungen sowie eine Myopathie mit Muskelschwäche, Myalgien und Belastungsintoleranz. Wichtige Symptomkonstellationen wurden als Syndrome beschrieben. Hierzu zählen das CPEO plus-Syndrom (CPEO mit Multisystembeteiligung), das MELAS-Syndrom (Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und Schlaganfall-ähnlichen Episoden), das MERRF-Syndrom (Myoklonusepilepsie mit Ragged-red-Fasern), das NARP-Syndrom (Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa), das MNGIE-Syndrom (Myo-neuro-gastrointestinale Enzephalopathie) sowie die subakute nekrotisierende Enzephalomyopathie (M. Leigh) des Kindesalters. Es gibt auch Manifestationsformen, die im wesentlichen auf ein Organ beschränkt bleiben, wie die Leber'sche hereditäre Opticus-Neuropathie (LHON). All diese Syndrome können sich im Sinne von Overlap-Syndromen auch überschneiden. Die Symptome der wichtigsten Syndrome sind in Tab. 1.1 aufgeführt.

**Tab. 1.1: Wichtige Syndrome mitochondrialer Enzephalomyopathien**

Syndrom	Symptome	Erbgang
<i>CPEO plus</i>	Ptosis, Ophthalmoplegie, Retinopathie, Extremitätenschwäche, kardiale Reizleitungsstörungen, Psychosyndrom/Demenz, Polyneuropathie, Minderwuchs, Diabetes mellitus, Ataxie, Innenohrschwerhörigkeit	Sporadisch Autosomal rezessiv Autosomal dominant Maternal
<i>MELAS</i>	Schlaganfallähnliche Episoden, Innenohrschwerhörigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, epileptische Anfälle, Demenz, Diabetes mellitus, Minderwuchs	Maternal
<i>MERRF</i>	Myoklonie, generalisierte epileptische Anfälle, Ataxie, Innenohrschwerhörigkeit, Extremitätenschwäche, Demenz, Optikusathrophie, Polyneuropathie	Maternal
<i>LHON</i>	Beidseitige schnell progrediente Visusminderung mit Zentralskotom, Opticusatrophie	Maternal
<i>Leigh</i>	Muskelhypotonie, psychomotorische Retardierung, Ophthalmoplegie, Ptosis, Nystagmus, Dystonie, epileptische Anfälle (Beginn bereits im frühen Kindesalter)	Autosomal rezessiv Maternal
<i>NARP</i>	Sensibele Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa, epileptische Anfälle	Maternal
<i>MNGIE</i>	Ophthalmoplegie, Ptosis, Darmmotilitätsstörungen, Diarrhoe, Pseudoobstruktion, Übelkeit, Erbrechen, Kachexie, Polyneuropathie, Leukenzephalopathie	Autosomal rezessiv

## 1.2 Entwicklung des Konzeptes der mitochondrialen Medizin

Der Begriff „mitochondriale Erkrankung“ unterliegt mit zunehmendem Kenntnisstand einer Wandlung. Seit der Erstbeschreibung einer Mutation im Bereich der mitochondrialen DNA im Jahre 1988 (Holt et al. 1988; Wallace et al. 1988) kam es zu einer sprunghaften Weiterentwicklung der Konzeptes der Mitochondriopathien. Man kam zu der Erkenntnis, dass neben den mitochondrialen Enzephalomyopathien viele andere Erkrankungen kausal oder in ihrer Pathogenese auf mitochondrialen Defekten beruhen. Mutationen der mitochondrialen oder der nukleären DNA und auch Kombinationen beider, die zu mitochondrial lokalisierten Defekten führen, wurden als Ursache vieler chronischer Erkrankungen erkannt (Shapira 1999; Finsterer 1997). Hierzu zählen insbesondere die neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Friedreichs Ataxie sowie Chorea Huntington. Aber auch bei einigen Formen der familiären Migräne, bei der multiplen symmetrischen Lipomatose, dem Pearson-Syndrom,



speziellen Kardiomyopathie-Formen sowie besonderen Formen des Typ I-Diabetes mellitus wird eine Beteiligung der Mitochondrien vermutet.

Neben diesen mit genetisch bedingten mitochondrialen Defekten assoziierten Erkrankungen scheinen die Mitochondrien bei verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen relevant zu sein. So ist bereits seit 1930 durch Otto Warburg die Rolle der Mitochondrien bei der Karzinogenese bekannt (Warburg et al. 1930). Etwa 40 Jahre später wurde erkannt, dass Ischämien und Reperfusion zu Schwellung und Funktionsbeeinträchtigung von Mitochondrien führen (Jennings et al. 1969; Jackson et al. 1997). Dies war die Grundlage für die spätere Entwicklung der Transplantationstechniken. Inzwischen gibt es auch zahlreiche Hinweise auf akute Schädigungen der Mitochondrien durch Antikörper (Schulze und Becker 1989), Toxine (Alston et al. 1977) sowie Sepsis (Trumbeckaite et al. 2001; Gellerich et al. 1999; Kudoh et al. 1998; Joshi et al. 2000).

Einen weiteren neuen Impuls erhielt die Forschung mit der Entdeckung der Rolle der Mitochondrien als Sensoren und Auslöser der Apoptose, wodurch sie als Target der Tumor-Therapie interessant wurden (Fulda et al. 1998). Da mit steigendem Lebensalter die Häufigkeit von Mutationen der mitochondrialen DNA exponentiell zunimmt, spielen die Mitochondrien wahrscheinlich auch beim Altern eine bedeutende Rolle.

Aufgrund der Beteiligung von Mitochondrien bei den unterschiedlichsten Krankheiten und Störungen erscheint zunehmend der Begriff „mitochondriale Medizin“ gerechtfertigt.

### **1.3 Biochemische Grundlagen**

#### **1.3.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien**

Mitochondrien sind intrazelluläre Organellen von etwa 2  $\mu\text{m}$  Länge, die in wechselnder Anzahl in allen eukaryotischen Zellen außer den Erythrozyten vorkommen. Sie bestehen aus einer glatten äußeren und einer stark gefalteten inneren Doppelmembran. Hierdurch entstehen zwei getrennte Kompartimente: der innere Matrixraum und der Intermembranspalt. Die Falten der inneren Membran werden Cristae genannt. In den verschiedenen Geweben sind die Anzahl der Mitochondrien sowie die Zahl und Form der Cristae unterschiedlich. Gewebe mit sehr intensivem oxidativen Stoffwechsel weisen viele Mitochondrien mit einer großen Anzahl von Cristae auf.

Die Außenmembran ist für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 8 kDa durchlässig, was durch Porinporen realisiert wird (Zalman et al. 1980). Da die effektive Porenöffnung nur etwa 1 % der Membranoberfläche ausmacht (Gellerich et al. 1994), kommt es zu einem messbaren Konzentrationsgradienten bei der Diffusion der Moleküle durch die Außenmembran. Neben den Porinporen enthält die Außenmembran u.a. die Carnitin-Palmitoyltransferase-1 sowie Enzyme der Lipidsynthese und des Proteinimports.

In die Innenmembran sind die Multienzymkomplexe der Atmungskette eingebettet. Da die Innenmembran impermeabel ist, existieren für die Substrate und Metabolite hochspezifische Translokatoren, die einen kontrollierten Stofftransport auch gegen ein Konzentrationsgefälle ermöglichen (Jerusalem und Zierz 1991). Außerdem ist hier die Permeability Transition Pore (PTP) lokalisiert, die bei reversibler Öffnung den Austritt mitochondrialer Calciumionen und bei irreversibler Öffnung den Untergang der betroffenen Mitochondrien (Mitoptose) bewirken kann (Bernardi et al. 1994; Pastorino et al. 1994; Halestrap et al. 1998).

Im Intermembranspalt sind ATP-verbrauchende Enzyme, wie die Acyl-CoA-Synthase, Creatinkinase und Adenylatkinase, lokalisiert. Teilweise ist die Außenmembran an sogenannten Kontaktstellen mit der Innenmembran verknüpft. Diese Kontaktstellen sind die Voraussetzung für den Proteintransport in die Mitochondrien (Pfanner et al. 1990). Die ATP-verbrauchenden Enzyme sind zum Teil an den Kontaktstellen lokalisiert, wodurch der ADP-Transport in die Mitochondrien erleichtert wird.

In der Matrix befinden sich mehrere Hundert Proteine verschiedener Enzymsysteme (Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Enzyme der  $\beta$ -Oxidation und des Zitratzyklus, in der Leber Teile des Harnstoff- sowie Ketonkörperzyklus). Sie enthält außerdem RNA- und DNA-Polymerasen, Peptidasen, Stressproteine für das Processing, Sorting und Assembling der importierten, im Zytosol gebildeten mitochondrialen Proteine sowie Ribosomen, rRNAs, tRNAs und die mitochondriale DNA (Cooper et al. 1994). Inzwischen konnten 750 mitochondriale Proteine in einer Hefezellenart (*Saccharomyces cerevisiae*) identifiziert werden (Sickmann et al. 2003). Damit gelang die Entschlüsselung von etwa 90 % aller mitochondrialen Proteine.

Mitochondrien werden als „biochemische Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da sie im Rahmen des oxidativen Abbaus von Nahrungsstoffen den größten Teil des ATP erzeugen, das die Zelle für alle wichtigen Reaktionen, wie Muskelkontraktion, Aufbau von Ionengradienten, Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden sowie Kohlenhydraten benötigt. In der normalen aeroben Zelle werden etwa 95 % des ATP durch die oxidative Phosphorylierung regeneriert, nur 5 % entstehen in der Glykolyse (Rapoport, 1983). Bei Defekten der Mitochondrien oder unter anaeroben Bedingungen steigt kompensatorisch die glykolytische ATP-Synthese, es kommt zur vermehrten Laktat-Bildung sowie zum Abfall der zytosolischen Kreatinphosphatkonzentration.

Über die Zellarbeit hinaus sind die Mitochondrien in wichtige Zellfunktionen eingebunden. So sind sie an spezifischen Synthesen, wie z.B. die der Orotsäure als Intermediärprodukt der Nukleotidsynthese, beteiligt. Auch bei der Harnstoff- und Porphyrinsynthese sowie der Glykoneogenese sind einige Teilreaktionen mitochondrial lokalisiert.

Die Mitochondrien spielen auch bei der Regulierung des programmierten Zelltodes eine entscheidene Rolle. Apoptose wird durch eine Signalkaskade vermittelt. Das Öffnen der PTP, die Freisetzung von Cytochrom c und eines Apoptose-induzierenden Faktors bewirken via Aktivierung von Caspasen die Auslösung der Apoptose (Bossy-Wetzel und Green 1999; Cai et al. 1998; Halestrap et al. 1998; Susin et al. 1998; Wolter et al. 1997).

### **1.3.2 Die oxidative Phosphorylierung**

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien ist die oxidative Phosphorylierung des bei der Zellarbeit entstehenden ADP zu ATP. Die Energie für diesen Vorgang wird aus der Knallgasreaktion gewonnen, bei der Sauerstoff mittels Substratwasserstoff zu Wasser reduziert wird. Die Knallgasreaktion verläuft in viele Teilreaktionen zerlegt an den Multienzymkomplexen der Atmungskette ab. Der Wasserstoff stammt aus dem Endabbau von Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten. Er wird über den im Matrixraum lokalisierten Zitratzyklus bereitgestellt und in die Atmungskette eingeschleust. Darüber hinaus existieren Shuttle-Mechanismen, um den aus der Glykolyse im Zytosol entstehenden Wasserstoff zur Atmungskette zu transportieren.

Das System der oxidativen Phosphorylierung setzt sich aus den vier Enzymkomplexen der Atmungskette und der ATP-Synthetase ( $F_0F_1$ -ATPase) zusammen. Abb. 1.1 gibt einen Überblick über das metabolische Schema der oxidativen Phosphorylierung.

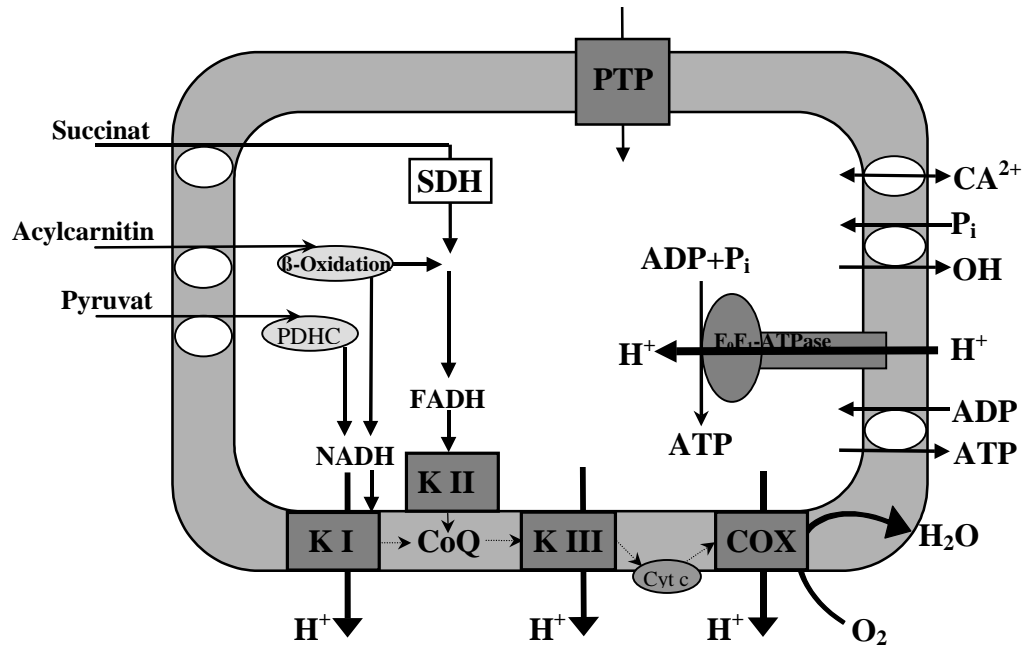


Abb. 1.1: Schema der oxidativen Phosphorylierung an der mitochondrialen Innenmembran (Löffler und Petrides 1998)

K I – Komplex I, K II – Komplex II, K III – Komplex III, K IV – Komplex IV, SDH – Succinat-Dehydrogenase, PDHC – Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, PTP – Permeability-Transition-Pore, Co Q – Coenzym Q,  $P_i$  – anorganisches Phosphat, Cyt c – Cytochrom c,  $Ca^{2+}$  – Calcium-Ionen,  $H^+$  – Protonen

Der **Komplex I** (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) ist der größte der Atmungsketten-Komplexe. Er besteht aus ca. 40 Untereinheiten, von denen sieben mitochondrial kodiert sind, und katalysiert die Oxidation von NADH mit Transfer von Elektronen zu Ubichinon, wodurch Ubichinol entsteht.

Der **Komplex II** (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase) ist der kleinste Komplex. Er setzt sich aus vier nukleär kodierten Untereinheiten zusammen und katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat mit einem Transfer von Elektronen zu Ubichinon.

Der **Komplex III** (Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) besteht aus 11 Untereinheiten, von denen eine mitochondrial kodiert ist, und transferiert Elektronen von Ubichinol zu Cytochrom c.

Der **Komplex IV** (Cytochrom-c-Oxidase) besteht aus 13 Untereinheiten, von denen drei mitochondrial kodiert sind, und katalysiert den Transfer von vier Elektronen vom reduzierten Cytochrom c zu molekularem Sauerstoff mit der Bildung von Wasser.

Durch den Transfer der bei der Oxidation frei werdenden Elektronen von Komplex zu Komplex werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranspalt gepumpt. Die Komplexe I, III und IV werden deshalb auch als Protonenpumpen bezeichnet. Komplex II ist keine Protonenpumpe, da die Änderung der freien Energie zu gering ist. Der dadurch entstehende elektrochemische Protonengradient liefert die Energie für die von der  $F_0F_1$ -ATPase katalysierten ATP-Synthese. Die ATP-Synthetase besteht aus 14 Untereinheiten, von denen zwei mitochondrial kodiert werden, und ist Bestandteil der Innenmembran. Das entstehende ATP wird über den Adenin-Nukleotid-Translokator (AdN-Translokator) im 1:1-Austausch gegen ADP in den Matrixraum ausgeschleust. Die Substratoxidation und Phosphorylierung sind über den elektrochemischen Protonengradienten eng miteinander gekoppelt. Die Mitochondrien oxidieren Substrat und verbrauchen Sauerstoff nur dann, wenn ADP und organisches Phosphat angeboten werden. Ein Sauerstoffverbrauch ohne gleichzeitige ATP-Bildung ist nicht möglich. Diese enge Kopplung wird als Atmungskontrolle bezeichnet. Auf der Basis dieser Erkenntnis haben Chance und Williams 1956 für isolierte Mitochondrien fünf Zustände definiert, bei denen die Atmungsgeschwindigkeiten durch jeweils verschiedene Faktoren kontrolliert werden.

**Tab. 1: Definition der Funktionszustände von isolierten Mitochondrien nach Chance (1956)**

	Im Überschuss vorhanden	Limitierende Faktoren für die Atmung
<b>State 1</b>	Sauerstoff	ADP, Substrat
<b>State 2</b>	Sauerstoff, Substrat	ADP
<b>State 3</b>	Sauerstoff, ADP, Substrat	Katalytische Kapazität der Atmungskettenenzyme
<b>State 4</b>	Sauerstoff, Substrat	ADP
<b>State 5</b>	ADP, Substrat	Sauerstoff

Besondere Bedeutung kommt dem State 4 und dem State 3 zu. State 4 entspricht dem Ruhezustand der Mitochondrien und wird auch als kontrollierter Zustand bezeichnet. Die extramitochondriale ADP-Konzentration ist so gering, dass kein ADP in die Mitochondrien transportiert wird. Die State 4-Atmung ist demnach die nicht phosphorylierende Atmung und hängt von der Intaktheit der Innenmembran ab. Mitochondrien, deren PTP geöffnet oder die aus anderen Gründen entkoppelt sind, haben eine erhöhte State 4-Atmung. Mit der Zellarbeit steigt der ATP-Verbrauch an, es kommt zur Anhäu-

fung von ADP und zum ADP-Transport in die Mitochondrien. Damit steigt die Atmungsgeschwindigkeit an (Intermediate State), bis schließlich der State 3 erreicht ist. Die Geschwindigkeit der biologischen Oxidation ist jetzt durch die Maximalgeschwindigkeit der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung limitiert.

Die einzelnen Enzyme der Atmungskette können durch jeweils spezifische Hemmstoffe in ihrer Funktion gehemmt werden. Die Wirkung dieser Hemmstoffe wird in der Respirometrie zur gezielten Untersuchung der einzelnen Enzymkomplexe genutzt. Erwähnt werden sollen Rotenon (Komplex I-Inhibitor), Antimycin A (Komplex III-Inhibitor), Atraktylat bzw. Carboxyatraktylat (Inhibitoren des AdN-Translokators) und Oligomycin (Inhibitor der  $F_0F_1$ -ATPase).

#### **1.4 Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen**

Die Diagnose mitochondrialer Enzephalomyopathien ist immer nur in der Zusammenschau von klinischem Bild, klinisch-chemischen Laborparametern, morphologischen, biochemischen und molekulargenetischen Befunden möglich. Bei klinischem Verdacht auf eine mitochondriale Enzephalomyopathie liefern laborchemische Untersuchungen wertvolle Hinweise (Trijbels et al. 1998). Hierbei werden erhöhte Ruhe-Laktat-Werte im Serum und eventuell auch im Liquor und Urin gefunden. Die Laktatkonzentration im Verhältnis zur Pyruvatkonzentration ist ebenfalls von diagnostischer Bedeutung und kann Defekte der Pyruvatdehydrogenase anzeigen. Bei einem Teil der Patienten zeigt sich der pathologische Laktatanstieg erst nach körperlicher (z.B. Fahrradbelastungstest) oder metabolischer Belastung (Glukosegabe). Die Laktatbestimmung kann jedoch nur als einfacher Screeningtest gelten, da ein pathologischer Laktatanstieg (unter Belastung abhängig vom Trainingszustand und der kardiopulmonalen Leistungsfähigkeit) nicht spezifisch für eine mitochondriale Enzephalomyopathie ist und normale Laktatspiegel eine mitochondriale Erkrankung nicht ausschließen (Zierz et al. 1989). Eine weitere wichtige nichtinvasive Methode zur Detektion von mitochondrialen Erkrankungen ist die NMR-Spektroskopie, welche die nichtinvasive Messung von ATP, Kreatinphosphat, Phosphat und Laktat im Gewebe ermöglicht (Bet et al. 1990). Aus der Resyntheserate von Kreatinphosphat nach einer definierten Maximalbelastung lassen sich Rückschlüsse auf die mitochondriale Funktion ziehen. Britton Chance hatte großen Anteil an

der Entwicklung der NIR-Spektroskopie. Mit dieser relativ einfachen Technik kann man die Oxygenierung der Muskulatur bei Belastung nichtinvasiv messen und so Defekte des Energiestoffwechsels detektieren (Bank und Chance 1994). Die Untersuchung der Mitochondrienfunktion mit den beschriebenen spektroskopischen Methoden ist insbesondere in Verbindung mit Belastungstests gut geeignet, Hinweise auf das Vorliegen mitochondrialer Defekte zu erhalten.

Für die metabolische Lokalisierung des Defektes sind jedoch histochemische, biochemische und molekulargenetische Untersuchungen der Mitochondrien in Biopsieproben notwendig. Das histochemische Kardinalphänomen einer mitochondrialen Myopathie stellt der Nachweis von COX-negativen Fasern mittels der COX/SDH-Doppelfärbung dar (Borthwick al. 1999). Weitere typische Zeichen sind eine Zunahme der Typ I-Fasern sowie lichtmikroskopisch darstellbare Ragged-red-Fasern. Hierbei handelt es sich um Muskelfasern, die in der modifizierten Trichomfärbung fuchsinrote, überwiegend subsarkolemmal und interfibrillär gelegene Mitochondrienagglomerationen aufweisen. Elektronenmikroskopisch lassen sich bei Mitochondriopathien eine Vergrößerung, Verkleinerung oder Vermehrung der Mitochondrien, Mitochondrien mit abnormer Struktur der Cristae sowie intramitochondriale Speicherung von Fett und Glycin bzw. parakristalline Einschlüsse nachweisen. Die elektronenmikroskopischen Befunde sind aber leider relativ unspezifisch, d.h. es scheint morphologisch auffällige Mitochondrien auch bei nichtmitochondrialen Erkrankungen zu geben. Eine sichere und seit langem etablierte Methode zur Auffindung mitochondrialer Defekte ist die enzymatische Bestimmung mitochondrialer Enzyme und der Komplexe der Atmungskette im Muskelgewebe (Fischer 1985). Es ist jedoch nicht möglich, auf diese Weise alle mitochondrialen Enzyme zu messen, so dass die Gesamtbeurteilung der Mitochondrien nur bruchstückhaft bleibt. Die quantitative Erfassung der Konzentration der meisten mitochondrialen Enzyme ist mit der blue-page-Elektrophorese möglich, wobei die mitochondrialen Proteine chromatographisch getrennt werden (Schägger 2001). Die Aktivität der Enzyme wird hierbei jedoch nicht erfasst.

Durch die Untersuchung der Mitochondrienfunktion in nativem Muskel wird es möglich, die oxidative Phosphorylierung als Gesamtprozess zu beurteilen. Aufgrund des Schwellenwertphänomens von Enzymaktivitätsveränderungen kommt es durch die unterschiedlichen Kontrolleigenschaften der betroffenen Enzyme zu unterschiedlichen

Auswirkungen auf das metabolische System. Deshalb sind funktionelle Untersuchungen zur Korrelation des molekularen Defektes mit dem klinischen Zustand des Patienten erforderlich. Zudem lassen sich einige der über 100 Enzyme, die für die oxidative Phosphorylierung verantwortlich sind, wie z.B die Translokatoren, nur in funktionell intakten Mitochondrien messen.

Zur funktionellen Untersuchung von Mitochondrien findet die oxygraphische Methode Anwendung. Man registriert den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien bei unterschiedlichen metabolischen Zuständen mittels hochauflösender Sauerstoffverbrauchsmessungen. Diese Messungen müssen an nativem Material durchgeführt werden. Als Untersuchungsobjekte können isolierte Mitochondrien oder permeabilisierte Muskelfasern dienen.

Die älteste Methode beruht auf der Isolation von Mitochondrien (Scholte et al. 1997; Rasmussen und Rasmussen 1997; Rasmussen et al. 1997; Rustin et al. 1994; Fischer et al. 1985). Aufgrund der überschaubaren metabolischen Bedingungen lassen sich Atmungsmessungen hiermit einfach durchführen. Mit der Präparation von isolierten Mitochondrien sind jedoch auch verschiedene Nachteile verbunden. Als entscheidender Nachteil erwies sich die geringe Ausbeute von 10 bis 30 % (Gellerich et al. 1995). Dadurch besteht die Gefahr, dass gerade die geschädigten Mitochondrien aufgrund veränderter Sedimentationseigenschaften bei der Präparation teilweise oder ganz verworfen werden. Somit bleibt ungewiss, ob die isolierten Mitochondrien einen repräsentativen Querschnitt der im Gewebe vorhandenen Mitochondrien darstellen. Nicht auszuschließen ist auch eine Schädigung der Mitochondrien durch den Isolationsstress (Saks et al. 1998). Wegen der geringen Ausbeute der Isolationsmethoden für Muskelmitochondrien benötigt man bei der Verwendung von isolierten Mitochondrien für eine einzelne Atmungsmessung etwa 400 mg Muskelgewebe, so dass diese Methode für routinemäßige oxygraphische Untersuchungen nicht geeignet ist. Die Mikromethode von Rasmussen benötigt nur etwa 50 bis 100 mg Muskel (Rasmussen et al. 1997). Da er gleichzeitig eine Ultra-Mikro-Respirometrie-Technik verwendet, kann eine ausreichende Zahl von Messungen durchgeführt werden. Allerdings bleibt trotzdem das Problem der geringen Ausbeute. Ein weiterer wesentlicher Nachteil ist die begrenzte, im Stundenbereich liegende, funktionelle Stabilität isolierter Mitochondrien. Versuche von Scholte durch Zusatz verschiedener Schutzsubstanzen waren nicht erfolgreich (Scholte et al. 1997).



### **1.5 Skinned fiber-Technik**

Als Alternative zur Verwendung von isolierten Mitochondrien wurde 1987 von Veksler an Endomyokardbiopsien die Skinned fiber-Technik entwickelt (Veksler et al. 1987). Diese Methode wurde später auch bei humanen Skelettmuskelfaserbiopsien angewandt. Die Muskelfasern werden bei der Skinned fiber-Technik zuerst mechanisch mit Hilfe von Nadeln und anschließend chemisch mit Saponin permeabilisiert. Das pflanzliche Glycosid Saponin besitzt eine hohe Affinität zu Cholesterol. Dadurch wird die Zellmembran zerstört, was am Austritt von Laktatdehydrogenase bemerkbar wird. Die Mitochondrien, das sarkoplasmatische Retikulum und die Myosin-ATPase werden durch Saponin jedoch nicht angegriffen und bleiben aufgrund ihres niedrigen Cholesterolgehaltes funktionell intakt. Von Kunz et al. (1993) konnte gezeigt werden, dass eine 30-minütige Saponin-Behandlung optimal ist, was zwischenzeitlich bestätigt werden konnte (Tonkonogi et al. 1998). Als großer Vorteil bei der Verwendung von permeabilisierten Muskelfasern gegenüber isolierten Mitochondrien erweist sich der deutlich geringere Materialbedarf, so dass routinemäßige Atmungsmessungen möglich sind. Darüber hinaus ist die Präparation deutlich weniger zeitaufwendig.

Aufgrund dieser Vorteile findet die Skinned fiber-Technik in Verbindung mit der hochauflösenden Respirometrie bei der Routinediagnostik von mitochondrialen Defekten zunehmend Verwendung. Als nachteilig erweisen sich bei Anwendung der Skinned fiber-Technik allerdings die Mikroheterogenitäten. Diese äußern sich in unterschiedlichen Mitochondriengehalten der Fasern und können Streuungen der Einzelwerte bei respirometrischen Messungen mit Fasern einer Muskelprobe bewirken. Der für funktionelle Untersuchungen generelle Nachteil einer begrenzten Stabilität der Mitochondrien spielt auch bei der Skinned fiber-Technik eine große Rolle. Erste Untersuchungen (Skladal et al. 1994) weisen jedoch auf eine deutlich verlängerte Stabilität der Mitochondrien in Muskelfasern gegenüber isolierten Mitochondrien hin.

## 2 Zielstellung der Arbeit

Die Charakterisierung der zeitlichen Stabilität von Mitochondrien in Muskelfasern ist von entscheidender Bedeutung. So können zwischen der Entnahme der Biopsie und der Untersuchung der Probe im Labor einige Stunden vergehen. Darüber hinaus erfordert die Analyse der Mitochondrienfunktion zu diagnostischen Zwecken zeitaufwendige Experimente, je nach Anzahl der vorhandenen Messgeräte sind mehrere Stunden erforderlich. Wegen der Komplexität der Untersuchungen und der Gefahr von Messartefakten wäre es ferner wünschenswert, für Kontrollmessungen Biopsiematerial konservieren zu können. Darüber hinaus ist die funktionelle Untersuchung von Mitochondrien aus Muskelbiopsien an apparative Voraussetzungen geknüpft, die nicht in jedem Labor gegeben sind. Aus diesem Grunde ist der Versand von nativen Muskelbiopsien in Speziallabors wünschenswert. Mit der Problematik der zeitlichen Stabilität von permeabilisierten Muskelfasern beschäftigten sich bislang nur wenige Arbeiten. Aufgrund der für isolierte Mitochondrien existierenden Datenlage muss von einer sehr begrenzten Stabilität ausgegangen werden.

Es bestand die Aufgabe, die Langzeitstabilität der Mitochondrienfunktion in normalen Muskelbiopsien zu charakterisieren und gegebenenfalls durch Optimierung der Lagerungsbedingungen zu verbessern. Schließlich sollten auf der Grundlage dieser Ergebnisse die respirometrischen Befunde von aus anderen Zentren zugeschickten Biopsien analysiert werden, um die Durchführbarkeit des Probenversandes zu demonstrieren.

Wegen des stark variierenden Mitochondriengehaltes in humanen Muskelfasern, sollte weiterhin versucht werden, ob es möglich ist, von der Mitochondrienmenge unabhängige Funktionsparameter zu etablieren und zu verwenden. Wegen der Häufigkeit Komplex I-abhängiger Funktionsdefizite, sollte dabei versucht werden, die Pyruvatatmung auf die (stabilere) Komplex II-abhängige Succinatatmung zu skalieren.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Lagerung von Muskelmaterial bis zu 48 Stunden im Storagepuffer auf die Mitochondrienfunktion für verschiedene Substrate (Pyruvat/Malat, Succinat, Glutamat/Malat, Palmitoylcarnitin/ Malat, Octanoylcarnitin/Malat)?

2. Ist die multiple Substrat-Inhibitor-Titration geeignet, um von der Mitochondrienmenge unabhängige Funktionsparameter zu gewinnen?
3. Lässt sich durch Optimierung des Kühlregimes eine verbesserte Konservierung erreichen?
4. Ist eine Lagerung des Muskelmaterials im bereits permeabilisierten Zustand ohne Funktionsverluste möglich?
5. Lässt sich durch Zusatz von Proteinase-Inhibitoren und eines Antibiotikums zum Storagepuffer eine bessere Konservierung der Mitochondrienfunktion erreichen?
6. Ist ein Versand von Biopsien zum Zwecke respirometrischer Untersuchungen möglich?
7. Unter welchen Transportbedingungen muss der Biopsieversand erfolgen, um zuverlässige Messungen durchführen zu können?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von den folgenden Herstellern bezogen: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Serva Feinbiochemie GmbH (Heidelberg), Boehringer Mannheim (Mannheim), Reanal (Budapest) und ICN (Costa Mesa). Verwendet wurden Malat, Pyruvat, Glutamat, Succinat, Octanoylcarnitin, Palmitoylcarnitin, Rinderserumalbumin (RSA), Saponin, MES, Dithiothreitol, Imidazol, Magnesiumchlorid, EGTA, EDTA, Sucrose, Tris, Rotenon, Atraktylat, Antimycin A aus *Streptomyces* sp., ADP, ATP, Taurin, Kaliumchlorid, Kreatinphosphat (CrP), Mannitol sowie Kaliumdihydrogenphosphat.

#### **3.2 Puffer und Pufferzusätze, Medien**

Für die Lagerung und Permeabilisierung der Muskelfasern wurde ein Standard-Storagepuffer folgender Zusammensetzung angewandt: 49 mM MES; 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20 mM Taurine; 0,5 mM Dithiothreitol; 29 mM Imidazol; 9,5 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; 5,2 mM ATP; 15 mM CrP; 0,1 M  $\text{K}_2\text{-Ca-EGTA}$ ; 0,1 mM K-EGTA. Diese Substanzen wurden mit Aqua bidestillata gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 5 M KOH auf 7,1 eingestellt. Der Storagepuffer wurde in 10 ml Portionen bei  $-18\text{ C}^\circ$  gelagert.

Zur Optimierung der Konservierung der Muskelfasern wurden dem Standard-Storagepuffer folgende Proteinase-Inhibitoren und folgendes Antibiotikum zugesetzt: Trypsin-Inhibitor (15,0  $\mu\text{g/ml}$ ), Benzamidine (15,5  $\mu\text{g/ml}$ ), Leupeptin (5,0  $\mu\text{g/ml}$ ), Pepstatin A (7,0  $\mu\text{g/ml}$ ), Gentamicin-Sulfat (10,0  $\mu\text{g/ml}$ ).

Die respirometrischen Messungen erfolgten in einem Inkubationsmedium folgender Zusammensetzung: 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 75 mM Mannitol; 25 mM Sucrose; 100 mM KCl; 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl; 0,5 mM Dithiothreitol. Der pH-Wert der in Aqua bidestillata gelösten Substanzen wurde auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei  $-18\text{ C}^\circ$ . Vor Gebrauch wurden 1mg RSA/ml Medium zugesetzt. Das RSA diente der Maskierung endogener Fettsäuren, die sonst zu einer Entkopplung der Mitochondrienfunktion führen würden.

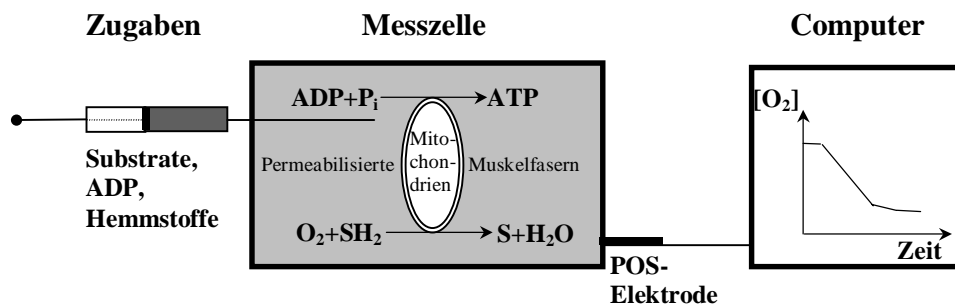
### 3.3 Messgeräte

Zur respirometrischen Messung wurde der von der Firma OROBOS Innsbruck (Österreich) produzierte OROBOROS<sup>®</sup>-Oxygraph verwendet. Die Permeabilisierung des Muskelmaterials erfolgte unter ständigem Schwenken auf einem Minishaker IKA Works, INC, Willmington, USA. Das Muskelmaterial wurde mit Hilfe der elektronischen Präzisionswaage Modell KERN 770/GS/GJ, Albstadt, Deutschland, gewogen.

### 3.4 Aufbau des Oxygraphen - Prinzip der Sauerstoffmessung

Der verwendete Oxygraph ist ein Zwei-Kammer-Titrations-Injektionsrespirometer für die hochauflösende Atmungsmessung. Jede Kammer kann mit Hilfe eines Stopfens luftdicht verschlossen werden. Im Inneren jedes Stopfens befindet sich eine dünne Kapillare, durch die mittels einer Injektionskanüle Substanzen in die Kammern gegeben werden können. Die Temperatur wird während der Messung konstant auf 30 °C gehalten. Das Kernstück des Oxygraphen bilden zwei polarographische Sauerstoffsensoren (POS-Elektroden), mit denen die Sauerstoffkonzentration in den beiden Messkammern gemessen wird. Die Sauerstoffsensoren bestehen aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode. Beide Elektroden sind von einer gesättigten Kaliumchloridlösung umgeben. Der gesamte Sensoraufbau ist mit einer dünnen, sauerstoffdurchlässigen Teflonmembran ummantelt. Der in der Probe enthaltene Sauerstoff kann durch die Membran diffundieren und wird dann an der Kathode reduziert. Der dabei gemessene Stromfluss ist der Sauerstoffkonzentration in der Messprobe direkt proportional. Durch kontinuierliches Rühren während der Messung mittels eines elektromagnetischen Rührers wird eine optimale Durchmischung gewährleistet und damit eine Sauerstoffverarmung in der Nähe der Kathode vermieden. Die Eichung der Sensoren erfolgte mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung durch Messungen des belüfteten Inkubationsmediums einerseits und nach Zugabe von Dithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) andererseits. Die Konzentration des im belüfteten Medium gelösten Sauerstoffes beträgt bei einer Temperatur von 30 °C und einem Luftdruck von 95 kPa 200 nmol/ml Medium. Durch Dithionit wird sämtlicher Sauerstoff chemisch verbraucht, so dass die Sauerstoffkonzentration nach Zugabe von Dithionit praktisch dem Nullwert entspricht.

Die mit den Sauerstoffsensoren kontinuierlich erfassten Daten wurden mit Hilfe des Programms DATGRAPH Analysis Software, OROBOROS<sup>®</sup> der Firma OROBOROS Innsbruck, Österreich, ausgewertet. Die Atmungsgeschwindigkeit ergibt sich dabei aus der Ableitung der über das erfasste Messsignal errechneten Sauerstoffkonzentration nach der Zeit. Die Oxidationsraten wurden auf das Feuchtgewicht der Muskelfasern bezogen [nmol O<sub>2</sub>/(min x mg Feuchtgewicht)].



**Abb. 2: Schematische Darstellung der respirometrischen Untersuchung der Mitochondrienfunktion im Oxygraphen**

P<sub>i</sub> – anorganisches Phosphat; SH<sub>2</sub> - Substrat; S - oxidiertes Substrat

In der luftdicht verschlossenen Messzelle befinden sich die permeabilisierten Muskelfasern im auf 30 °C temperierten Inkubationsmedium. Über eine Kapillare werden mit einer Kanüle die Substrate, ADP und Hemmstoffe zugegeben. Mit der POS-Elektrode erfolgt die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration in der Messzelle. Die gewonnenen Daten werden an einen Computer übertragen und ausgewertet.

### 3.5 Probengewinnung

Für die Lagerungs- und Optimierungsexperimente wurde Muskelmaterial von orthopädischen Patienten genutzt. Ein wichtiges Auswahlkriterium war eine normal entwickelte Muskulatur ohne myo- und neuropathologischen Veränderungen. Die Patienten wiesen lediglich degenerative Gelenkserkrankungen (Gon- oder Coxarthrosen) auf und wurden durch eine Hüft- bzw. Kniegelenksoperationen endoprothetisch versorgt. Die Gewinnung des Muskelmaterials erfolgte in der Klinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg während der in Allgemeinanästhesie vorgenommenen Endoprothesenimplantation. Die Probenentnahme erfolgte am Musculus vastus lateralis oder medialis. Jede Biopsie stammt von einem anderen Patienten. Die Untersuchungen wurden durch die zuständige Ethik-Kommission genehmigt.

Zur Überprüfung der Durchführbarkeit des Probenversandes für diagnostische Zwecke wurden von anderen Kliniken in das Muskellabor der Martin-Luther-Universität Halle-

Wittenberg verschickte Biopsien untersucht. Dabei handelte es sich um Muskelmaterial von Patienten mit Verdacht auf eine mitochondriale Störung. Der Versand erfolgte dabei aus den Städten Münster, Saarbrücken, Jena, Berlin, Hamburg, Stuttgart, Minden, Bielefeld, Erlangen, Duisburg, Karlsruhe und Leipzig.

Die Patienten waren zwischen 9 und 76 Jahre alt. Es wurden Patienten beiderlei Geschlechts einbezogen.

### **3.6 Aufarbeitung der Proben**

#### **3.6.1 Präparation des Muskelmaterials**

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

#### **3.6.2 Permeabilisieren der Muskelfasern**

Etwa 25 mg Muskelgewebe wurden auf einer Petrischale möglichst fein in einzelne Faserbündel zerfasert. Diese Faserbündel wurden in 1 ml Storagepuffer, welchem 50 µg Saponin zugesetzt wurde, überführt. In dieser Lösung wurden die Fasern 30 Minuten bei 4 °C unter vorsichtigem Rühren auf einem Minishaker (Rührergeschwindigkeit=100 U/min) inkubiert.

#### **3.6.3 Waschen der permeabilisierten Muskelfasern**

Zur Beendigung des Saponin-Permeabilisationsschrittes wurden die Muskelfasern viermal in 1 ml eiskaltem Inkubationsmedium gespült. Dadurch wurden Saponin und andere Bestandteile des Storagepuffers aus den Fasern herausgewaschen.

### 3.6.4 Bestimmung des Feuchtgewichtes der Muskelproben

Zur Ermittlung des Feuchtgewichtes der Muskelproben wurden mehrere Faserbündel von insgesamt etwa 8 bis 10 mg auf ein Deckgläschen überführt und mit einer Präzisionswaage gemessen. Zuvor wurde durch kurzzeitiges Ablegen der Fasern auf Filterpapier das anhaftende Inkubationsmedium entfernt.

### 3.7 Respirometrische Messung

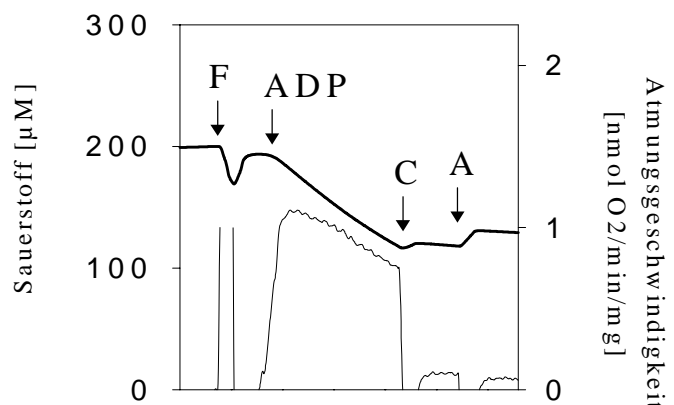
Die Messkammern wurden mit je 1,86 ml Inkubationsmedium gefüllt. Bei geöffneten Messkammern und eingeschaltetem Magnetrührer wurde das Medium belüftet. Nach wenigen Minuten wurde die Sättigung mit Luftsauerstoff erreicht, was an einer konstanten Sauerstoffkonzentration erkennbar war. Anschließend wurden die Substratlösungen, abhängig vom geplanten Testansatz, in die Messkammer pipettiert. Bei den Standardtestansätzen wurden 10 mM Pyruvat/ 2 mM Malat, 10 mM Succinat, 10 mM Glutamat/ 2 mM Malat, 1 mM Palmitoylcarnitin/ 2 mM Malat oder 1 mM Octanoylcarnitin/ 2 mM Malat als Substrate verwendet. Die Muskelfasern wurden mit einer Pinzette in die Messkammern gebracht, wonach diese verschlossen wurden. Das Volumen des Messansatzes betrug 1,42 ml. Die Messungen begannen mit der Registrierung des Sauerstoffverbrauchs in Gegenwart der Substrate ohne ADP (State 2). Diese Atmung war sehr gering. Nachdem der Sauerstoffverbrauch einen stationären Wert erreicht hatte, erfolgte die maximale Stimulation der mitochondrialen Atmung durch Zusatz von 2 mM ADP. Nach 10 Minuten wurde die Phosphorylierung durch Zugabe von 50  $\mu$ M Atrakylylat gehemmt. Der Zusatz von 10  $\mu$ M Antimycin A bewirkte letztlich die völlige Unterbindung des Sauerstoffverbrauches an der Atmungskette. In der Abb. 3.2 wird der Standard-Testansatz an einem Beispiel schematisch dargestellt.

#### Abb. 3.2: Standard-Testansatz

Die Messungen erfolgten in Gegenwart von 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat.

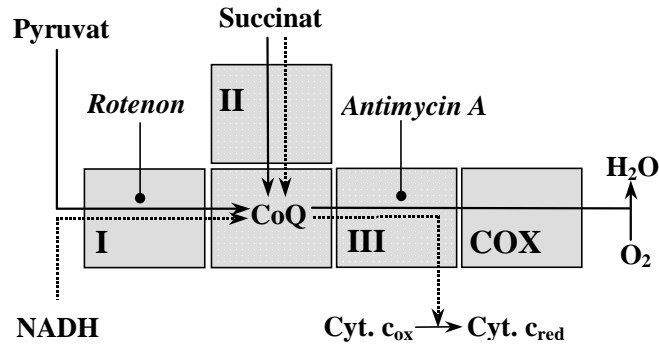
Zusätze: F - permeabilisierte Fasern; ADP - 2 mM ADP; C - 50  $\mu$ M Atrakylylat; A - 10  $\mu$ M Antimycin A.

Die obere Kurve stellt die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer dar [ $\mu$ M] (linke Ordinate). Die untere Kurve zeigt die auf Feuchtgewicht bezogene Atmungsgeschwindigkeit [ $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$  Feuchtgewicht] (rechte Ordinate).





Darüber hinaus wurde bei zugeschickten Proben sowie bei einem Langzeitexperiment die multiple Substrat-Inhibitor-Titration, dessen Prinzip in Abb. 3.3 schematisch erläutert wird, angewandt.



**Abb. 3.3: Prinzip der respirometrischen Untersuchung der Komplexe der Atmungskette mit Hilfe der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration**

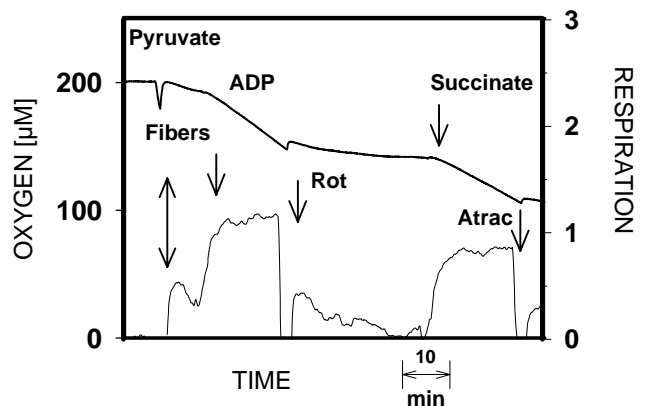
I - Komplex I, II – Komplex II; III – Komplex III, COX – Cytochrom-c-Oxidase; CoQ – Coenzym Q; Cyt. c<sub>ox</sub> – Cytochrom c (oxidiert); Cyt. c<sub>red</sub> – Cytochrom c (reduziert)

Nach Bestimmung der Komplex I-abhängigen Pyruvatatmung erfolgte die Hemmung des Komplexes I mit Rotenon. Anschließend wurde die Komplex II-abhängige Succinatatmung im gleichen Testansatz gemessen. Durch Zugabe von Atraktolat (nicht gezeigt) wurde die Phosphorylierung gehemmt und anschließend durch Antimycin A der Elektronentransport am Komplex III gehemmt. Durch Skalierung der Pyruvat-abhängigen auf die Succinat-abhängige Atmung können Defekte des Komplexes I detektiert werden und eine vom Mitochondriengehalt der Fasern unabhängige Atmungsrate bestimmt werden.

Nach Bestimmung der State 3-Atmung für die Substrate 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat erfolgte durch Zugabe von 3  $\mu$ M Rotenon und 10 mM Succinat die Messung der Succinat-abhängigen Atmung. Mit 50  $\mu$ M Atraktolat wurde die Phosphorylierung gehemmt und durch Zugabe von 10  $\mu$ M Antimycin A erfolgte die Einstellung der Antimycin-resistenten Atmung (Darstellung in Abb. 3.4).

**Abb. 3.4: Multiple Substrat-Inhibitor-Titration**

Die Messungen erfolgten in Gegenwart von 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat sowie 10 mM Succinat. Zusätze: F - permeabilisierte Fasern; ADP - 2 mM ADP; Rot - 3  $\mu$ M Rotenon; Atrac - 50  $\mu$ M Atraktolat. Die obere Kurve stellt die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer dar [ $\mu$ M] (linke Ordinate). Die untere Kurve zeigt die auf Feuchtgewicht bezogene Atmungsgeschwindigkeit [ $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg Feuchtgewicht}$ ] (rechte Ordinate).



### **3.8 Funktionsparameter**

#### **3.8.1 Aktive Atmung**

Durch Zugabe von ADP wurde die Atmung maximal stimuliert und die substratabhängige aktive Atmung (State 3) stellte sich ein. Die Messzeit nach ADP-Zusatz betrug 10 Minuten. Die State 3-Atmung kurz nach ADP-Zugabe wurde mit  $ADP_{\text{Start}}$  und nach 10 Minuten mit  $ADP_{\text{Ende}}$  bezeichnet. Die Änderung der Atmungsgeschwindigkeit ( $ADP_{\text{Diff}}$ ) berechnete sich aus der Differenz dieser beiden Werte.

#### **3.8.2 Succinat-bezogene Pyruvatatmung (SRPR)**

Zur Detektion von Komplex I-abhängigen funktionellen Veränderungen wurde die Pyruvat-abhängige State 3-Atmung auf die Succinat-abhängige State 3-Atmung im gleichen Messansatz bezogen (Multiple Substrat-Inhibitor-Titration), wodurch sich die dimensionslose SRPR ergab.

#### **3.8.3 Citratsynthase-normierte Pyruvatatmung**

Durch den Bezug der Pyruvatatmung auf ein geeignetes Markerenzym wurde die Normierung der Atmungsraten auf den Mitochondriengehalt möglich. Hierzu wurde die Aktivität der in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Citratsynthase (CS) herangezogen, welche mit dem Mitochondriengehalt der Probe korreliert (Schwermann et al. 1989).

#### **3.8.4 Atraktylat-insensitive Atmung**

Die morphologische Intaktheit der permeabilisierten Fasern bedingte einen beträchtlichen Konzentrationsgradienten zwischen den Mitochondrien und der Bulkphase des umgebenden Mediums, was ein Ansteigen der Michaelis-Menten-Konstante der oxidativen Phosphorylierung für ADP zur Folge hatte. Deshalb mussten zur Einstellung der aktiven Atmung sehr hohe ADP-Konzentrationen gewählt werden. Während man bei isolierten Mitochondrien üblicherweise State 3 /State 4-Übergänge untersucht, kann bei Muskelfasern die Phosphorylierung des im großen Überschuss zugegeben ADP nicht

vollständig erfolgen. Es ist aber möglich, die Phosphorylierung durch Zusatz von Atraktolat, einem spezifischem Hemmstoff des AdN-Translokators, zu hemmen. Die sich dann einstellende Atraktolat-insensitive Atmung besteht aus der Leak-Atmung sowie dem nichtenzymatischem und extramitochondrialem Sauerstoffverbrauch. Obwohl der Begriff der State 4-Atmung für isolierte Mitochondrien definiert wurde und er genau genommen mit der Atraktolat-insensitiven Atmung nicht identisch ist, wurden in dieser Arbeit zur Vereinfachung beide Begriffe gleichgesetzt.

### **3.8.5 Antimycin-resistente Atmung**

Die Zugabe von Antimycin A unterbricht den Elektronentransport am Komplex III der Atmungskette. Der unter diesen Bedingungen messbare Sauerstoffverbrauch kommt durch nichtenzymatische und extramitochondriale Reduktion von Sauerstoff zustande und wird als Antimycin-resistente Atmung bezeichnet.

### **3.8.6 Leak-Atmung**

Aus der Differenz der Atraktolat-insensitiven und der Antimycin-resistenten Atmung ergibt sich die Leak-Atmung. Sie wird durch den Rückfluss von Protonen durch die Innenmembran in den Matrixraum von Mitochondrien ermöglicht und gibt Informationen über Permeabilitätsänderungen in der mitochondrialen Innenmembran durch Entkopplung oder Permeability Transition.

### **3.8.7 Respiratorischer Kontrollquotient**

Der respiratorische Kontrollquotient (RCI) errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{RCI} = \frac{\text{State 3-Atmung [nmol O}_2\text{/min/mg Feuchtgewicht]}}{\text{Atraktolat-insensitive Atmung [nmol O}_2\text{/min/mg Feuchtgewicht]}}$$

Er ist ein Maß für die Kopplung der oxidativen Phosphorylierung und gibt Auskunft über die Intaktheit der Mitochondrien. Durch Schädigungen der mitochondrialen Innenmembran wird der Rückfluss von Protonen in den Matrixraum möglich. Somit kommt es zur Substratoxidation ohne ATP-Synthese. Je kleiner der Zahlenwert ist, desto stärker ist die Schädigung der Mitochondrien.

### **3.9 Lagerung der Muskelfasern im Storagepuffer**

Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der Mitochondrien in Abhängigkeit von der Lagerungszeit wurden die Muskelfasern der einzelnen Biopsieproben über einen längeren Zeitraum in Storagepuffer gelagert. Vor der Einlagerung erfolgte eine grobe Zerkleinerung des Muskels, bei der das Material in Muskelbündel von etwa 40 mg Feuchtgewicht zerfasert wurde. Diese Muskelbündel wurden in der Kühlzelle in Storagepuffer auf Eis gelagert. Das Wechseln des Storagepuffers erfolgte alle 6 bis 8 Stunden. Bei sehr lipid- oder blutreichen Proben erfolgte bei Eintrüben des Puffers ein häufigerer Wechsel.

Aus technischen Gründen war bei einigen Experimenten eine ununterbrochene Kühlung nicht möglich. Die Muskelfasern wurden zwar auf Eis bei 4 °C gelagert, die Präparation der Muskelfasern sowie die anschließende Permeabilisation erfolgte jedoch bei Zimmertemperatur. Das gesamte Muskelmaterial wurde so wiederholt Zimmertemperaturen ausgesetzt. Erst durch die Verwendung einer begehbaren Kühlzelle war die Aufbereitung des Muskelmaterial ununterbrochen bei 4 °C möglich. Die Messungen dieser unterschiedlich gehandhabten Proben wurden separat analysiert.

### **3.10 Lagerung permeabilisierter Muskelfasern in Storagepuffer**

Um den Einfluss einer Lagerung von Muskelfasern im bereits permeabilisierten Zustand auf die funktionellen Eigenschaften charakterisieren zu können, wurde das gesamte Muskelmaterial einer Biopsie gleichzeitig permeabilisiert. Die Permeabilisation erfolgte wie oben beschrieben. Nach 30 Minuten wurden die Fasern in Inkubationsmedium gewaschen und bis zur oxygraphischen Messung im Inkubationsmedium bei 4 °C aufbewahrt. Die Lagerung erfolgte dabei auf Eis in der Kühlzelle.

### **3.11 Statistische Verfahren**

Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen „Sigma Plot for Windows“, „Sigma Stat for Windows“ sowie „SPSS“ durchgeführt.

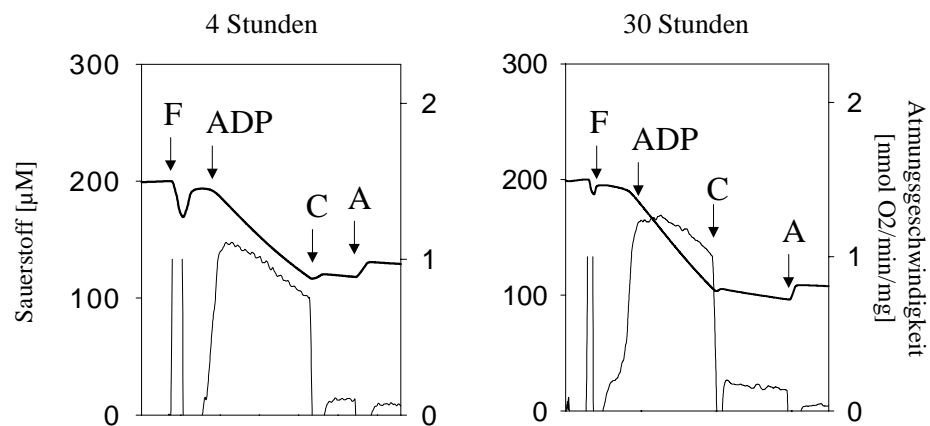
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zeitliche Stabilität der funktionellen Eigenschaften von Mitochondrien

Zur Untersuchung der zeitlichen Stabilität der Mitochondrienfunktion wurden die Muskelfasern einer Biopsie in Storagepuffer gelagert. Über den gesamten Lagerungszeitraum wurden wiederholt Faserbündel dieser Biopsie präpariert und respirometrisch untersucht, wobei immer der gleiche Versuchsansatz verwendet wurde. Alle Einzelinkubationen mit Fasern der gleichen Biopsie wurden unter einem „Langzeitexperiment“ (I-XII) zusammengefasst. Mit jedem Substrat wurden mehrere Langzeitexperimente durchgeführt.

#### 4.1.1 Einfluss der Lagerungszeit auf die Pyruvatatmung

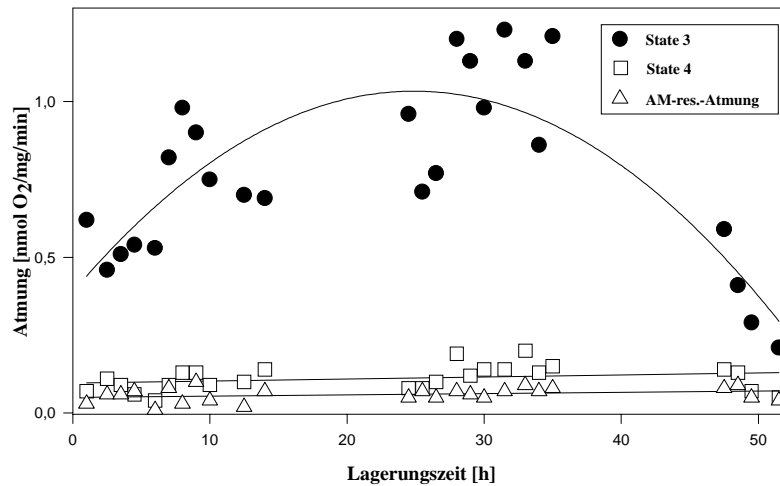
In Abb. 4.1 werden zwei Einzelmessungen eines (I) von vier (I, II, III, IV) Langzeitexperimenten nach unterschiedlichen Lagerungszeiten dargestellt.



**Abb. 4.1: Respirometrische Untersuchung der Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern nach 4 bzw. 30 Stunden Lagerungszeit**

Die Messungen erfolgten in Gegenwart von 2 mM Pyruvat und 2 mM Malat. Durch Pfeile bezeichnete Zusätze: F - permeabilisierte Fasern; ADP - 2 mM ADP; C - 50 μM Atractylat; A - 10 μM Antimycin A. Die obere Kurve stellt die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer dar [μM], (linke Ordinate). Die untere Kurve zeigt die auf Feuchtgewicht bezogene Atmungsgeschwindigkeit [nmol O<sub>2</sub>/min/mg] (rechte Ordinate). Nach 30 Stunden Lagerung war keine funktionelle Störung der Mitochondrien zu erkennen, die State 3-Atmung war leicht angestiegen, die intakte Atractylat-Hemmung sowie die niedrige Antimycin-resistente Atmung bezeugten funktionell intakte Mitochondrien.

Die Atmungsraten aller Einzelinkubationen eines typischen Langzeitexperimentes sind in Abhängigkeit von der Lagerungszeit in der Abb. 4.2 beispielhaft dargestellt.



**Abb. 4.2: Darstellung eines typischen Langzeitexperimentes mit den Einzelmesswerten der Pyruvatatmung in Abhängigkeit von der Lagerungszeit**

Die Muskelfasern wurden in grob zerteiltem Zustand bis zu 52 Stunden gelagert und unmittelbar vor der oxygraphischen Messung permeabilisiert. Die Messungen erfolgten wie in Abb. 4.1 dargestellt mit 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat als Substrate. Die State 3-Atmung, State 4-Atmung und Antimycin-resistente Atmung jeder Einzelinkubation sind in Abhängigkeit von der Lagerungszeit dargestellt. Jedem Messpunkt entspricht eine Inkubation. Als State 3-Atmung wurde die unmittelbar nach ADP-Zusatz gemessene Atmungsrate angesehen ( $ADP_{\text{Start}}$ ).

Bei Lagerung bis 36 Stunden ( $n=21$ ) zeigte sich eine signifikante Zunahme von State 3 und State 4 über die Zeit ( $p<0.005$ ). Der RCI (Werte nicht gezeigt) blieb jedoch ohne signifikante Änderung, was eine funktionelle Intaktheit der Mitochondrien über eine Lagerungszeit von 36 Stunden belegt.

Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Experimenten zu ermöglichen, wurde die Lagerungszeit in vier Zeitabschnitte von je 12 Stunden unterteilt, innerhalb derer aus den Einzelinkubationen mehrerer Faserpräparationen eines Patienten bzw. einer Biopsie gemittelte Atmungsraten gebildet wurden. Die Werte des ersten Lagerungsabschnittes dienten als Kontrollwerte (=100 %).

Tab. 4.1 zeigt die gemittelten Atmungsraten der einzelnen Lagerungsabschnitte für jedes der vier Langzeitexperimente.

**Tab. 4.1: Einfluss der Lagerung auf die Atmungsparameter bei der Veratmung von Pyruvat**

*Exp* – Nummer des Langzeitexperimentes; *LZ* – Lagerungszeit in Stunden; *n* – Anzahl der Einzelmessungen pro Zeitabschnitt;  $ADP_{Start}$  – State 3–Atmung sofort nach Zugabe von ADP;  $ADP_{Diff}$  – Differenz zwischen State 3–Atmung unmittelbar und 10 Minuten nach Zugabe von ADP; *State 4* – Atraktolat-insensitive Atmung; *Leak* – Leak-Atmung, *RCI* – Respiratorischer Kontrollquotient. Atmungsgeschwindigkeiten in  $nmolO_2/min/mg \pm SD$ .

Spalte [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollwerten mit Lagerungszeit von bis zu 12 Stunden (=100%). \*=signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu Kontrollwerten.

<b>LZ</b>	<b>n</b>	<b><math>ADP_{Start}</math></b>	<b>[%]</b>	<b><math>ADP_{Diff}</math></b>	<b>[%]</b>	<b>State 4</b>	<b>[%]</b>	<b>Leak</b>	<b>[%]</b>	<b>RCI</b>	<b>[%]</b>
<b>Exp. I</b>											
0 - 12	5	1,15 ± 0,42	[100]	0,30 ± 0,09	[100]	0,14 ± 0,06	[100]	0,05 ± 0,03	[100]	9,61 ± 5,96	[100]
>12 - 24	4	1,34 ± 0,36	[117]	0,34 ± 0,27	[113]	0,17 ± 0,07	[121]	0,06 ± 0,05	[120]	8,83 ± 3,89	[92]
>24 - 36	6	1,46 ± 0,32	[127]	0,18 ± 0,12	[60]	0,21 ± 0,06	[150]	0,13 ± 0,06*	[260]	7,36 ± 1,10	[77]
>36	2	1,06 ± 0,04	[92]	0,08 ± 0,01	[27]	0,31 ± 0,01	[221]	0,22 ± 0,01	[440]	3,43 ± 0,29	[36]
<b>Exp. II</b>											
0 - 12	9	0,68 ± 0,19	[100]	0,19 ± 0,07	[100]	0,09 ± 0,03	[100]	0,04 ± 0,03	[100]	7,61 ± 1,72	[100]
>12 - 24	3	0,81 ± 0,16	[119]	0,20 ± 0,01*	[105]	0,11 ± 0,02*	[122]	0,07 ± 0,02	[175]	7,39 ± 2,42	[97]
>24 - 36	9	1,02 ± 0,20*	[150]	0,29 ± 0,07*	[153]	0,14 ± 0,04*	[156]	0,07 ± 0,03*	[175]	7,35 ± 1,23	[97]
>36	3	0,42 ± 0,16	[62]	0,13 ± 0,07	[68]	0,12 ± 0,02	[133]	0,05 ± 0,01	[125]	3,36 ± 0,78	[44]
<b>Exp. III</b>											
0 - 12	9	0,89 ± 0,16	[100]	0,21 ± 0,06	[100]	0,11 ± 0,02	[100]	0,08 ± 0,04	[100]	8,55 ± 2,04	[100]
>12 - 24	3	1,02 ± 0,13	[115]	0,27 ± 0,13	[129]	0,13 ± 0,03*	[118]	0,09 ± 0,05	[113]	8,23 ± 2,62	[96]
>24 - 36	9	1,13 ± 0,12*	[127]	0,32 ± 0,10*	[152]	0,14 ± 0,03*	[127]	0,10 ± 0,05*	[125]	8,47 ± 1,80	[99]
>36	3	0,47 ± 0,24	[53]	0,15 ± 0,07	[71]	0,11 ± 0,05	[100]	0,09 ± 0,04	[113]	4,09 ± 0,69*	[48]
<b>Exp. IV</b>											
0 - 12	9	0,92 ± 0,31	[100]	0,25 ± 0,10	[100]	0,16 ± 0,03	[100]	0,08 ± 0,04	[100]	5,90 ± 2,52	[100]
>12 - 24	5	1,12 ± 0,24	[122]	0,33 ± 0,06	[132]	0,19 ± 0,04*	[119]	0,09 ± 0,05	[113]	5,89 ± 1,32	[100]
>24 - 36	6	1,01 ± 0,29	[110]	0,38 ± 0,18	[152]	0,18 ± 0,04	[113]	0,10 ± 0,05	[125]	5,54 ± 1,19	[94]
>36	5	0,83 ± 0,21	[90]	0,20 ± 0,05	[80]	0,20 ± 0,03	[125]	0,09 ± 0,04	[113]	4,09 ± 0,86	[69]

Die Kontrollwerte der maximalen Atmungsraten ( $ADP_{Start}$ ) der einzelnen Langzeitexperimente zeigten, wie zu erwarten war, individuelle Unterschiede. Sie ergaben aber keinen Hinweis auf eine gestörte Mitochondrienfunktion. Bis zu einer Lagerungszeit von 12 bis 36 Stunden war bei allen Experimenten ein Ansteigen der maximalen Atmungsraten auf 110 bis 150 % zu beobachten. Bei Lagerung über 36 Stunden fielen die Atmungsraten in allen vier Experimenten jedoch auf 53 bis 90 % der Basiswerte ab.

Neben der initialen State 3-Atmung ( $ADP_{\text{Start}}$ ) wurden auch die  $ADP_{\text{Diff}}$ -Werte angegeben, die die zeitliche Stabilität der State 3-Atmung widerspiegeln. Bis auf einzelne Ausnahmen fielen die Atmungsraten regelmäßig während der State 3-Phase ab. Auffällig war die Zunahme der Instabilität der State 3-Atmung bis zu einer 36-stündigen Lagerung, erkennbar an den ansteigenden  $ADP_{\text{Diff}}$ -Werten. Bei weiterer Lagerung kam es wieder zur Stabilisierung der aktiven Atmung.

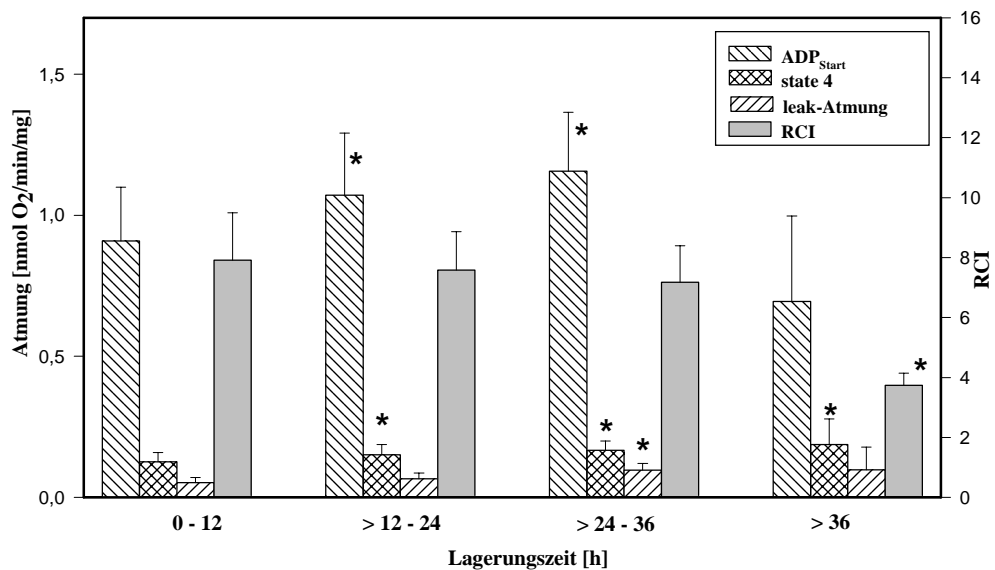
Die Basiswerte der State 4-Atmungsraten zeigten individuelle Unterschiede. Bezieht man die State 4-Raten jedoch auf die entsprechenden  $ADP_{\text{Start}}$ -Werte, so zeigt sich, dass die kontrollierten Atmungsraten 12 % (Experiment I und III), 13 % (Experiment II) bzw. 17 % (Experiment IV) der aktiven Atmungen ausmachten, die Werte also durchaus vergleichbar waren. Bei allen vier Experimenten zeigte sich ein Ansteigen der State 4-Atmung im Verlauf der Lagerung des Muskelmaterials. Bei den Experimenten II, III und IV bewegten sich die relativen Werte zwischen 110 % und 156 %. Auffällig war die annähernde Verdopplung des Ausgangswertes auf 221 % im Experiment I. Dies ist vermutlich nicht auf eine individuelle Instabilität, sondern vielmehr auf Unterschiede im Kühlregime zurückzuführen.

Die Antimycin-gehemmten Atmungsraten lagen unter den State 4-Werten und ließen keine tendenzielle Veränderung über die Lagerungszeit erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Leak-Atmung zeigte nur im Experiment I eine tendenzielle Veränderung. Hier war durch das Ansteigen der Atraktylat-gehemmten Atmung bei gleich bleibender Antimycin-Atmung ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen.

In den Experimenten II, III und IV blieben die RCI-Werte während der Lagerung bis zu 36 Stunden konstant. Im Experiment I ergab sich dagegen ein stärkerer Abfall auf 77 % des Ausgangswertes. Die Ursache ist wohl wiederum in der unterschiedlichen Kühlung zu suchen. Nach einer Lagerungszeit von über 36 Stunden trat in allen Fällen ein starker Abfall der RCI-Werte auf.

In der Abb. 4.3 werden die Mittelwerte aus allen Einzelmessungen der vier Biopsien im jeweiligen Zeitabschnitt zusammenfassend dargestellt.





**Abb. 4.3: Pyruvat-abhängige Atmung in Abhängigkeit von der Lagerungszeit**

Die Messungen wurden mit 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus den für jedes der vier Langzeitexperimente gemittelten Werten für ADP<sub>Start</sub>, State 4-Atmung und Leak-Atmung sowie den RCI aus n Einzelbestimmungen im jeweiligen Lagerungszeitraum. \*= signifikante Unterschiede im Vergleich zu Basiswerten mit einer Lagerungszeit von bis zu 12 Stunden. Es wird deutlich, dass die Mitochondrien bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden funktionell intakt blieben, die State 3- und State 4-Atmungsraten stiegen signifikant an, weshalb der RCI bis zu einer Lagerungszeit von 36 Stunden konstant blieb.

#### 4.1.2 Einfluss der Lagerungszeit auf die Succinatatmung

Die Beeinflussung der Succinatveratmung durch eine Lagerung der Muskelfasern wurde anhand zweier Langzeitexperimente analysiert (Experimente V und VI), deren jeweiligen Mittelwerte aus den Einzelmessungen pro Lagerungsabschnitt in Tab. 4.2 dargestellt sind.

Die Sauerstoffverbrauchsraten im State 3 stiegen mit zunehmender Lagerungszeit bis zu 36 Stunden an. Der Maximalwert wurde im zweiten Zeitabschnitt erreicht. Nach über 36 Stunden Lagerung fiel die State 3-Atmung unter das Niveau des Basiswertes ab.

Die State 4-Atmung zeigte bei beiden Experimenten ein unterschiedliches Verhalten. Im Experiment V stiegen die Werte mit zunehmender Lagerungszeit kontinuierlich an, was für eine zunehmende Entkopplung der Mitochondrien sprach. Im anderen Experiment blieb die State 4-Atmung über die gesamte Lagerung konstant.

Dementsprechend waren die RCI-Werte im Experiment V nach 24 Stunden deutlich vermindert, während sie sich im Experiment VI über 36 Stunden auf dem gleichen Niveau hielten und erst in der vierten Zeitperiode abfielen.

Bedingt durch die hohen State 4-Atmungsraten waren beim Experiment V die hohen Leak-Atmungsraten auffällig, die im Verlauf der Lagerung noch weiter anstiegen. Im Experiment VI traten deutlich niedrigere und stabile Werte der Leak-Atmung auf.

Die Stabilität der Atmungsraten während der State 3-Phase zeigte ein ähnliches Verhalten, wie es für Pyruvat beschrieben wurde. Auch hier war nach über 36 Stunden Lagerung die aktive Atmung zeitlich stabiler als in den vorigen Zeitabschnitten, in denen die Atmungsraten während der 10-minütigen State 3-Phase teilweise deutlich abfielen.

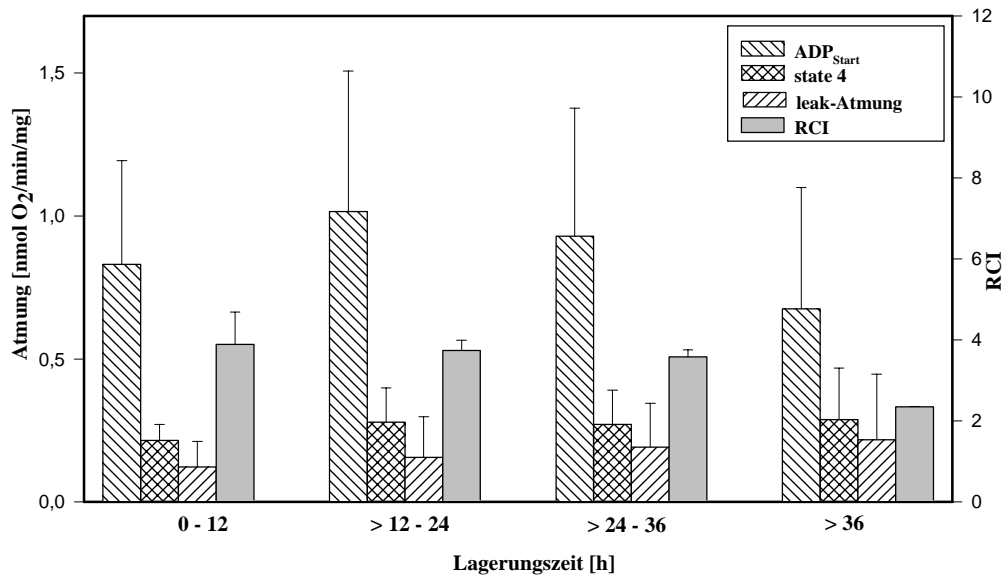
**Tab. 4.2: Einfluss der Lagerung auf die Atmungsparameter bei der Veratmung von Succinat**

*Exp* – Nummer des Langzeitexperimentes; *LZ* – Lagerungszeit in Stunden; *n* – Anzahl der Einzelmessungen pro Zeitabschnitt;  $ADP_{Start}$  – State 3-Atmung sofort nach Zugabe von ADP;  $ADP_{Diff}$  – Differenz zwischen State 3-Atmung unmittelbar und 10 Minuten nach Zugabe von ADP; *State 4* – Atraktolat-insensitive Atmung; *Leak* – Leak-Atmung, *RCI* – Respiratorischer Kontrollquotient. Atmungsgeschwindigkeiten in  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg} \pm \text{SD}$ .

Spalte [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollwerten mit Lagerungszeit von bis zu 12 Stunden (=100%). \*=signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu Kontrollwerten.

<i>LZ</i>	<i>n</i>	$ADP_{Start}$	[%]	$ADP_{Diff}$	[%]	<i>State 4</i>	[%]	<i>Leak</i>	[%]	<i>RCI</i>	[%]
<b>Exp. V</b>											
0-12	11	$1,09 \pm 0,26$	[100]	$0,36 \pm 0,22$	[100]	$0,25 \pm 0,07$	[100]	$0,19 \pm 0,08$	[100]	$4,46 \pm 1,19$	[100]
> 12-24	6	$1,36 \pm 0,29$	[125]	$0,44 \pm 0,25$	[122]	$0,36 \pm 0,09$	[144]	$0,26 \pm 0,08$	[137]	$3,92 \pm 1,16$	[88]
> 24-36	5	$1,25 \pm 0,31$	[115]	$0,43 \pm 0,21$	[119]	$0,36 \pm 0,10$	[144]	$0,30 \pm 0,11$	[158]	$3,70 \pm 1,14$	[83]
> 36	2	$0,98 \pm 0,25$	[90]	$0,17 \pm 0,06$	[47]	$0,42 \pm 0,09$	[168]	$0,38 \pm 0,11$	[200]	$2,34 \pm 0,07$	[52]
<b>Exp. VI</b>											
0-12	10	$0,57 \pm 0,19$	[100]	$0,22 \pm 0,12$	[100]	$0,18 \pm 0,02$	[100]	$0,06 \pm 0,03$	[100]	$3,33 \pm 1,27$	[100]
> 12-24	5	$0,67 \pm 0,16$	[118]	$0,25 \pm 0,13$	[114]	$0,19 \pm 0,03$	[106]	$0,06 \pm 0,03$	[100]	$3,57 \pm 1,13$	[107]
> 24-36	5	$0,61 \pm 0,09$	[107]	$0,21 \pm 0,05$	[95]	$0,19 \pm 0,05$	[106]	$0,08 \pm 0,03^*$	[133]	$3,46 \pm 0,87$	[104]
> 36	2	$0,38 \pm 0,05$	[67]	$0,11 \pm 0,02$	[50]	$0,16 \pm 0,03$	[89]	$0,06 \pm 0,05$	[100]	$2,35 \pm 0,11$	[71]

Die Mittelwerte beider Lagerungsexperimente wurden pro Lagerungsabschnitt in der folgenden Abbildung 4.4 zusammengefasst.



**Abb. 4.4: Succinat-abhängige Atmung in Abhängigkeit von der Lagerungszeit**

Die Messungen wurden mit 10 mM Succinat durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus den für jedes der zwei Langzeitexperimente gemittelten Werte für ADP<sub>Start</sub>, State 4-Atmung und Leak-Atmung sowie den RCI aus n Einzelbestimmungen im jeweiligen Lagerungszeitraum. Es wird deutlich, dass die Mitochondrien bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden funktionell intakt blieben, die State 3-Atmungsraten und der RCI zeigen keine Veränderung über eine Lagerungszeit von 36 Stunden.

#### 4.1.3 Einfluss der Lagerungszeit auf die Glutamatatmung

Die Veratmung des Substrates Glutamat wurde ebenfalls anhand zweier Langzeitexperimente (Experiment VII und VIII) untersucht, deren Einzelwerte in Tab. 4.3 aufgeführt sind. Die ADP-Verbrauchsraten bewegten sich in beiden Experimenten über 36 Stunden Lagerungszeit nicht unter das Ausgangsniveau. Im Experiment VIII zeigten die Werte zunächst nach 24 Stunden einen leichten Anstieg, um nach über 36 Stunden unter den Basiswert abzufallen. Im Experiment VII blieben die Werte über die gesamte Zeit konstant. Die State 4-Atmung zeigte im Experiment VIII keine tendenziellen Veränderungen, dagegen war im Experiment VII im Laufe der Lagerung ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Bedingt durch diesen Anstieg der State 4-Atmung im Experiment VII fielen die RCI-Werte schon nach kurzer Lagerung ab. Die RCI-Werte im Experiment VIII zeigten dagegen nur einen leichten Rückgang. Die Atmungsraten während der State 3-Phase zeigten auch bei diesem Substrat über eine Lagerung von 36 Stunden zunächst eine zunehmende Instabilität mit abnehmenden Atmungsraten während der 10-minütigen Messung, stabilisierten sich bei weiterer Lagerung jedoch wieder.

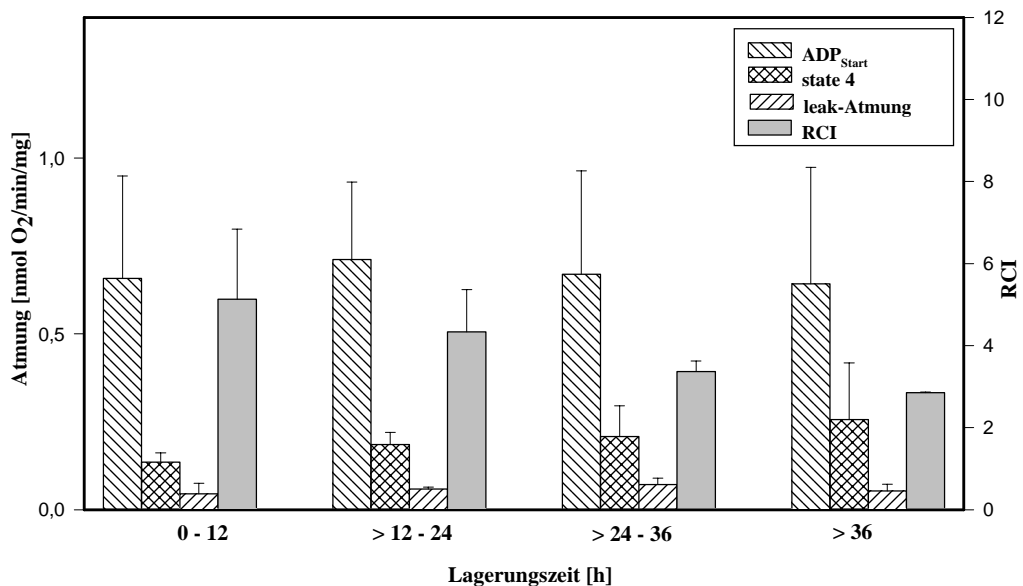
**Tab. 4.3: Einfluss der Lagerung auf die Atmungsparameter bei der Veratmung von Glutamat**

*Exp* – Nummer des Langzeitexperimentes; *LZ* – Lagerungszeit in Stunden; *n* – Anzahl der Einzelmessungen pro Zeitabschnitt;  $ADP_{Start}$  – State 3–Atmung sofort nach Zugabe von ADP;  $ADP_{Diff}$  – Differenz zwischen State 3–Atmung unmittelbar und 10 Minuten nach Zugabe von ADP; *State 4* – Atraktolat-insensitive Atmung; *Leak* – Leak-Atmung, *RCI* – Respiratorischer Kontrollquotient. Atmungsgeschwindigkeiten in  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg} \pm \text{SD}$ .

Spalte [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollwerten mit Lagerungszeit von bis zu 12 Stunden (=100%). \*=signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu Kontrollwerten.

LZ	n	$ADP_{Start}$	[%]	$ADP_{Diff}$	[%]	State 4	[%]	Leak	[%]	RCI	[%]
<b>Exp. VII</b>											
0-12	10	$0,86 \pm 0,25$	[100]	$0,18 \pm 0,14$	[100]	$0,15 \pm 0,06$	[100]	$0,07 \pm 0,05$	[100]	$6,25 \pm 2,33$	[100]
>12-24	5	$0,87 \pm 0,21$	[101]	$0,24 \pm 0,12$	[133]	$0,21 \pm 0,13$	[140]	$0,06 \pm 0,06$	[86]	$5,06 \pm 2,32$	[81]
>24-36	4	$0,88 \pm 0,19$	[102]	$0,26 \pm 0,09^*$	[144]	$0,27 \pm 0,10$	[180]	$0,08 \pm 0,05$	[114]	$3,55 \pm 1,35^*$	[57]
>36	3	$0,88 \pm 0,06$	[102]	$0,11 \pm 0,04$	[61]	$0,37 \pm 0,20$	[247]	$0,04 \pm 0,01$	[57]	$2,84 \pm 1,40^*$	[45]
<b>Exp. VIII</b>											
0-12	8	$0,45 \pm 0,11$	[100]	$0,15 \pm 0,05$	[100]	$0,12 \pm 0,01$	[100]	$0,05 \pm 0,01$	[100]	$3,91 \pm 1,04$	[100]
>12-24	6	$0,56 \pm 0,07$	[124]	$0,19 \pm 0,11$	[127]	$0,16 \pm 0,03^*$	[133]	$0,05 \pm 0,03$	[100]	$3,60 \pm 1,01$	[92]
>24-36	5	$0,46 \pm 0,19$	[102]	$0,11 \pm 0,06$	[73]	$0,15 \pm 0,05$	[125]	$0,06 \pm 0,02$	[120]	$3,18 \pm 0,65$	[81]
>36	5	$0,37 \pm 0,23$	[91]	$0,10 \pm 0,06$	[67]	$0,14 \pm 0,08$	[117]	$0,06 \pm 0,06$	[120]	$2,86 \pm 0,88$	[73]

In Abb. 4.5 erfolgt eine zusammenfassende Darstellung.

**Abb. 4.5: Glutamat-abhängige Atmung in Abhängigkeit von der Lagerungszeit**

Die Messungen wurden mit 10 mM Glutamat und 2 mM Malat durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus den für jedes der zwei Langzeitexperimente gemittelten Werten für  $ADP_{Start}$ , State 4-Atmung und Leak-Atmung sowie den RCI aus *n* Einzelbestimmungen im jeweiligen Lagerungszeitraum. Bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden blieben die State 3-Atmungsraten konstant, der RCI zeigte hier aufgrund eines Experimentes einen Abfall nach über 24 Stunden Lagerungszeit. Die Ursache hierfür ist wohl in den nicht optimalen Lagerungsbedingungen (unterbrochene Kühlkette) zu sehen (siehe Abschnitt 4.3.1).

#### 4.1.4 Einfluss der Lagerungszeit auf die Palmitoylcarnitinatmung

Die Untersuchung der zeitabhängigen Veränderung der Mitochondrienfunktion bei der Veratmung von Palmitoylcarnitin erfolgte in zwei Experimenten (IX und X), die in Tabelle 4.4 dargestellt werden.

**Tab. 4.4 Einfluss der Lagerung auf die Atmungsparameter bei der Veratmung von Palmitoylcarnitin**

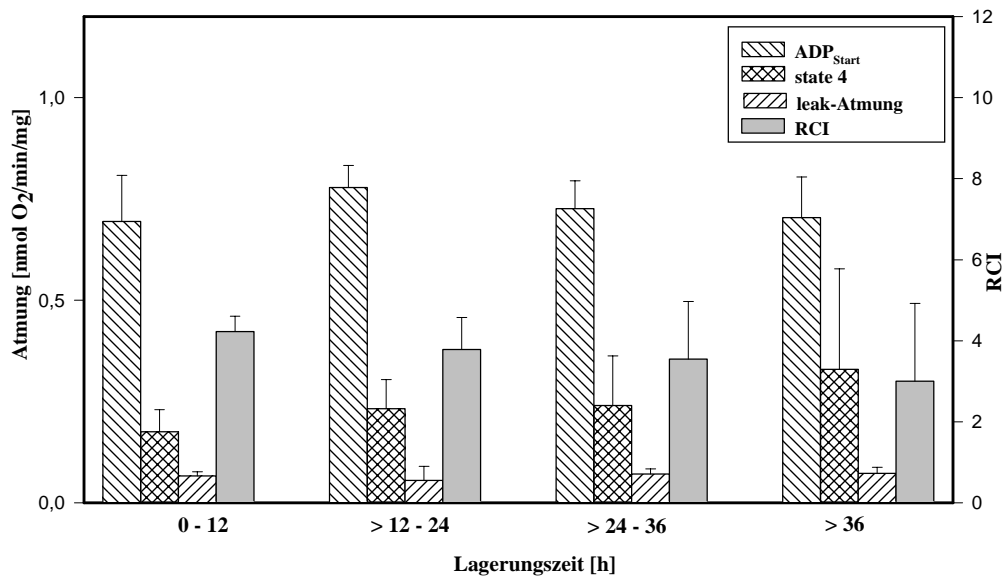
*Exp* – Nummer des Langzeitexperimentes; *LZ* – Lagerungszeit in Stunden; *n* – Anzahl der Einzelmessungen pro Zeitabschnitt; *ADP<sub>Start</sub>* – State 3–Atmung sofort nach Zugabe von ADP; *ADP<sub>Diff.</sub>* – Differenz zwischen State 3–Atmung unmittelbar und 10 Minuten nach Zugabe von ADP; *State 4* – Atraktolat-insensitive Atmung; *Leak* – Leak-Atmung, *RCI* – Respiratorischer Kontrollquotient. Atmungsgeschwindigkeiten in nmolO<sub>2</sub>/min/mg ± SD. Spalte [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollwerten mit Lagerungszeit von bis zu 12 Stunden (=100%). \*=signifikante Unterschiede (p<0.05) im Vergleich zu Kontrollwerten.

<b>LZ</b>	<b>n</b>	<b>ADP<sub>Start</sub></b>	<b>[%]</b>	<b>ADP<sub>Diff.</sub></b>	<b>[%]</b>	<b>State 4</b>	<b>[%]</b>	<b>Leak</b>	<b>[%]</b>	<b>RCI</b>	<b>[%]</b>
<b>Exp. IX</b>											
0-12	13	0,77 ± 0,12	[100]	0,29 ± 0,12	[100]	0,21 ± 0,08	[100]	0,07 ± 0,05	[100]	3,96 ± 1,30	[100]
> 12-24	3	0,82 ± 0,15	[106]	0,31 ± 0,21	[107]	0,28 ± 0,10	[133]	0,03 ± 0,02	[43]	3,22 ± 1,53	[81]
> 24-36	7	0,78 ± 0,14	[101]	0,24 ± 0,12	[83]	0,33 ± 0,13	[157]	0,08 ± 0,01	[114]	2,55 ± 0,70*	[64]
> 36	4	0,78 ± 0,23	[101]	0,10 ± 0,03*	[34]	0,51 ± 0,23	[243]	0,06 ± 0,03	[86]	1,65 ± 0,35	[42]
<b>Exp. X</b>											
0-12	8	0,61 ± 0,14	[100]	0,28 ± 0,12	[100]	0,14 ± 0,03	[100]	0,06 ± 0,02	[100]	4,49 ± 0,50	[100]
> 12-24	5	0,74 ± 0,15	[121]	0,32 ± 0,17*	[114]	0,18 ± 0,06	[129]	0,08 ± 0,04	[133]	4,34 ± 1,21	[97]
> 24-36	7	0,68 ± 0,17	[111]	0,34 ± 0,05	[121]	0,15 ± 0,05	[107]	0,06 ± 0,04	[100]	4,55 ± 0,87	[101]
> 36	3	0,63 ± 0,06	[103]	0,23 ± 0,10	[82]	0,15 ± 0,05	[167]	0,08 ± 0,04	[133]	4,36 ± 1,19	[97]

Die maximale Atmungsgeschwindigkeit stieg im zweiten Lagerungszeitraum an, um nach 36 Stunden Lagerung wieder etwa den Ausgangswert zu erreichen. Bei diesen beiden Experimenten war die Palmitoylcarnitin-abhängige Atmung auch nach über 36 Stunden Lagerung stabil. Die State 4-Atmung stieg beim Experiment IX während der Lagerung stetig an. Im dritten Zeitabschnitt wurden bereits deutlich höhere Werte erreicht, woraus auf eine Schädigung der Mitochondrien geschlossen werden kann. Beim Experiment X war dagegen die Atraktolat-Hemmung auch nach 36 Stunden Lagerung noch intakt. Der RCI-Wert zeigte, bedingt durch das Verhalten der State 4-Atmung, im Experiment IX eine stetige Verminderung über die Zeit, während er im Experiment X stabil war. Die über den gesamten Lagerungszeitraum stabilen Leak-Atmungen ließen

keine Schädigung der Innenmembran erkennen. Die ADP-Differenz-Werte stiegen im Verlaufe der Lagerung erst an, um sich dann unter das Ausgangsniveau zu bewegen.

Die in beiden Experimenten erhaltenen Daten wurde in der Abb. 4.6 zusammengefasst.



**Abb. 4.6: Palmitoylcarnitinabhängige Atmung in Abhängigkeit von der Lagerungszeit**

Die Messungen wurden mit 10 mM Palmitoylcarnitin und 2 mM Malat durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus den für jedes der zwei Langzeitexperimente gemittelten Werten für ADP<sub>Start</sub>, State 4-Atmung und Leak-Atmung sowie den RCI aus n Einzelbestimmungen im jeweiligen Lagerungszeitraum. Es zeigt sich keine signifikanten Änderungen über die gesamte Lagerungszeit.

#### 4.1.5 Einfluss der Lagerungszeit auf die Octanoylcarnitinatmung

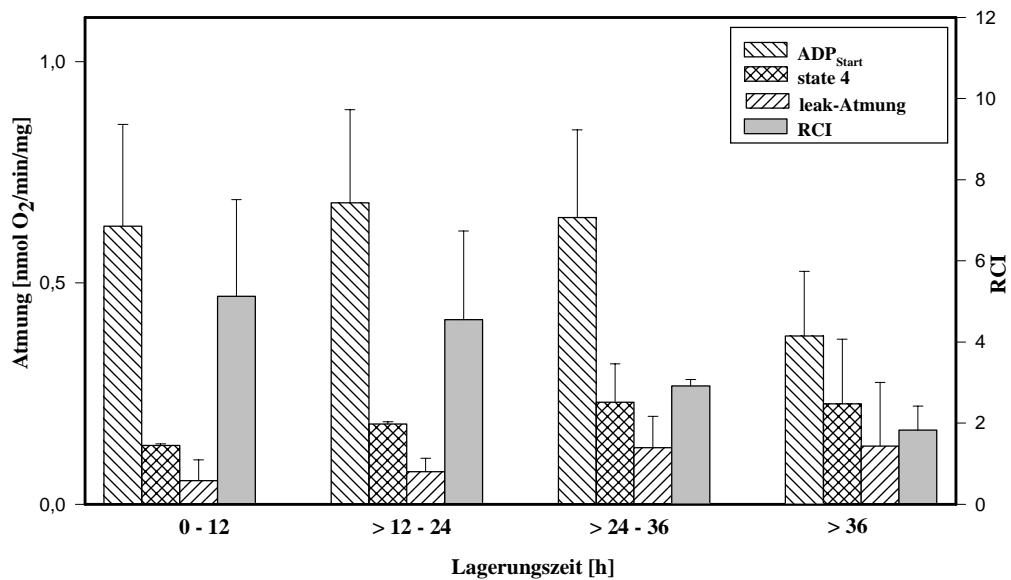
Die Veratmung des Substrates Octanoylcarnitin wurde in zwei Experimenten (XI und XII) untersucht. Wie in Tab. 4.5 dargestellt, waren die State 3-Atmungen in beiden Experimenten bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden konstant. Die State 4-Atmung zeigte im Experiment XI einen kontinuierlichen Anstieg über die Zeit, dagegen blieb sie im Experiment XII bis zu 36 Stunden ohne wesentliche Veränderungen. Bedingt durch den Anstieg der State 4-Atmung fiel im Experiment XI der RCI deutlich ab, während die Leak-Atmung anstieg. Der stabilere RCI im anderen Experiment zeigte eine bessere Kopplung der Mitochondrien. Die Leak-Atmung wies keine tendenziellen Veränderungen auf. Die ADP-Differenz-Werte verhielten sich wie in den übrigen Experimenten, nach einem Anstieg folgte ein deutlicher Abfall.

**Tab. 4.5 Einfluss der Lagerung auf die Atmungsparameter bei der Veratmung von Octanoylcarnitin**

*Exp* – Nummer des Langzeitexperimentes; *LZ* – Lagerungszeit in Stunden; *n* – Anzahl der Einzelmessungen pro Zeitabschnitt;  $ADP_{Start}$  – State 3–Atmung sofort nach Zugabe von ADP;  $ADP_{Diff}$  – Differenz zwischen State 3–Atmung unmittelbar und 10 Minuten nach Zugabe von ADP; *State 4* – Atraktolat-insensitive Atmung; *Leak* – Leak-Atmung, *RCI* – Respiratorischer Kontrollquotient. Atmungsgeschwindigkeiten in  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg} \pm \text{SD}$ . Spalte [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zu Kontrollwerten mit Lagerungszeit von bis zu 12 Stunden (=100%). \*=signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu Kontrollwerten.

LZ	N	$ADP_{Start}$	[%]	$ADP_{Diff}$	[%]	State 4	[%]	Leak	[%]	RCI	[%]
<b>Exp. XI</b>											
0-12	11	$0,79 \pm 0,13$	[100]	$0,12 \pm 0,09$	[100]	$0,13 \pm 0,05$	[100]	$0,09 \pm 0,05$	[100]	$6,81 \pm 2,53$	[100]
>12-24	3	$0,83 \pm 0,18$	[105]	$0,15 \pm 0,16$	[125]	$0,19 \pm 0,12$	[146]	$0,10 \pm 0,08$	[111]	$6,10 \pm 4,96$	[90]
>24-36	5	$0,79 \pm 0,13$	[100]	$0,10 \pm 0,05$	[83]	$0,29 \pm 0,05^*$	[223]	$0,18 \pm 0,06$	[200]	$2,81 \pm 0,87^*$	[41]
>36	3	$0,48 \pm 0,09$	[61]	$0,02 \pm 0,02$	[17]	$0,33 \pm 0,03$	[254]	$0,23 \pm 0,06$	[256]	$1,42 \pm 0,11$	[21]
<b>Exp. XII</b>											
0-12	9	$0,47 \pm 0,13$	[100]	$0,16 \pm 0,05$	[100]	$0,14 \pm 0,03$	[100]	$0,05 \pm 0,02$	[100]	$3,44 \pm 0,59$	[100]
>12-24	5	$0,53 \pm 0,14$	[113]	$0,20 \pm 0,13$	[125]	$0,18 \pm 0,02$	[129]	$0,05 \pm 0,02$	[100]	$3,01 \pm 0,83$	[88]
>24-36	4	$0,51 \pm 0,18$	[109]	$0,13 \pm 0,04^*$	[81]	$0,17 \pm 0,06$	[121]	$0,08 \pm 0,06$	[160]	$3,03 \pm 0,73$	[88]
>36	3	$0,28 \pm 0,06$	[60]	$0,09 \pm 0,04$	[56]	$0,12 \pm 0,02$	[86]	$0,03 \pm 0,01$	[60]	$2,25 \pm 0,27^*$	[65]

Zusammenfassend werden die Ergebnisse in Abb. 4.7 dargestellt.

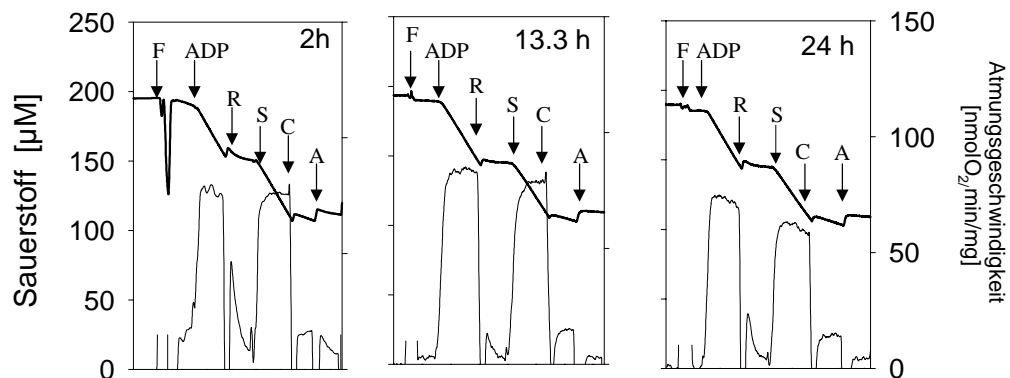
**Abb. 4.7: Octanoylcarnitin-abhängige Atmung versus Lagerungszeit**

Die Messungen wurden mit 1 mM Octanoylcarnitin und 2 mM Malat durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus den für jedes der vier Langzeitexperimente gemittelten Werten für  $ADP_{Start}$ , State-4-Atmung und Leak-Atmung sowie den RCI aus *n* Einzelbestimmungen im jeweiligen Lagerungszeitraum. Bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden blieben die State 3-Atmungsraten konstant, der RCI zeigte hier aufgrund eines Experimentes einen deutlichen Abfall nach über 12 Stunden Lagerungszeit. Die Ursache hierfür ist wohl in den nicht optimalen Lagerungsbedingungen (unterbrochene Kühlkette) zu sehen (siehe Abschnitt 4.3.1.).

#### 4.1.6 Multiple Substrat-Inhibitor-Titration

Bei den bisher beschriebenen Experimenten erfolgte der Bezug der Sauerstoffverbrauchsraten auf das Feuchtgewicht der Probe. Die schon erwähnten Mikroheterogenitäten und der daraus folgende schwankende Mitochondriengehalt der Fasern konnten Schwankungen der Messwerte bedingen. Wir versuchten deshalb einen inneren Referenzwert zu erzeugen, der vom Mitochondriengehalt unabhängig ist. Durch Skalierung der Pyruvatatmung auf die Succinatatmung in der gleichen Faser sollte man differenzieren können, ob eine verminderte Pyruvatatmung die Folge eines Komplex I-Defektes ist oder einfach die Folge eines verminderten Mitochondriengehaltes.

Mit dem im Abschnitt 3.7 beschriebenen Testansatz der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration wurde ein Experiment mit Lagerung der Muskelfasern über 32 Stunden durchgeführt. In regelmäßigen Zeitabständen erfolgten insgesamt 28 Einzelmessungen. Abb. 4.8 zeigt drei Einzelinkubationen zu unterschiedlichen Lagerungszeiten.



**Abb. 4.8: Respirometrische Untersuchung der Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern mit der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration nach unterschiedlicher Lagerungszeit**

Die Messungen erfolgten nach 2, 13,3 bzw. 24 Stunden Lagerungszeit nach dem Prinzip der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration mit den Substraten 10 mM Pyruvat, 2 mM Malat. Durch Pfeile bezeichnete Zusätze: F - permeabilisierte Fasern; ADP - 2mM ADP; R - 10 µM Rotenon; S - 10 mM Succinat; C - 50µM Atraktylat; A - 10µM Antimycin A. Die obere Kurve stellt die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer dar [µM] (linke Ordinate). Die untere Kurve zeigt die auf Feuchtgewicht bezogene Atmungsgeschwindigkeit [nmol O<sub>2</sub>/min/mg Feuchtgewicht] (rechte Ordinate). Über die Lagerung ist hier keine funktionelle Störung des Komplexes I zu erkennen, die SRPR betrug 102 % (2 h), 106 % (13,3 h) bzw. 118 % (24 h).

Die auf das Feuchtgewicht bezogenen Atmungsraten für die Veratmung der Substrate Pyruvat/Malat werden in Abb. 4.9 A dargestellt. Wenn man von den drei markierten Messungen absieht, lagen die Messwerte innerhalb des Normalbereiches. Im Laufe der



Lagerung bis zu 32 Stunden stieg die auf SRPR leicht - aber signifikant - an. In Übereinstimmung mit den bereits dargestellten Experimenten, zeigte sich also auch hier eine funktionelle Stabilität der Mitochondrien bis zu mindestens 32 Stunden Lagerung. Die Langzeitlagerung führte offensichtlich nicht zu Veränderungen des Komplexes I.

Die State 3-Atmungsraten für die Messungen 1, 2, und 3 lagen weit unterhalb des Mittelwertes der State 3-Atmung. Im Falle von Einzelmessungen wären pathologische Veränderungen der Mitochondrien hier nicht sicher auszuschließen. Bezieht man die Pyruvatatmung jedoch auf die Succinatatmung (Abb. 4.9 B), so liegen auch diese Werte innerhalb des Mittelwertbereiches. Es lag also in diesen Proben keine spezifisch verminderte Pyruvatatmung vor, sondern diese Fasern enthielten wahrscheinlich nur weniger Mitochondrien als die anderen.

Mit Anwendung dieser Methode lassen sich die Messwertschwankungen deutlich reduzieren. Betrachtet man die ersten fünf Messwerte, bei denen Lagerungseffekte noch keine Rolle spielen sollten, so ergibt sich bei der Pyruvat-abhängigen State 3-Atmung eine Schwankung um den Faktor 2,4. Die auf die Succinatatmung bezogene Pyruvatatmung schwankte jedoch lediglich um den Faktor 1,3.

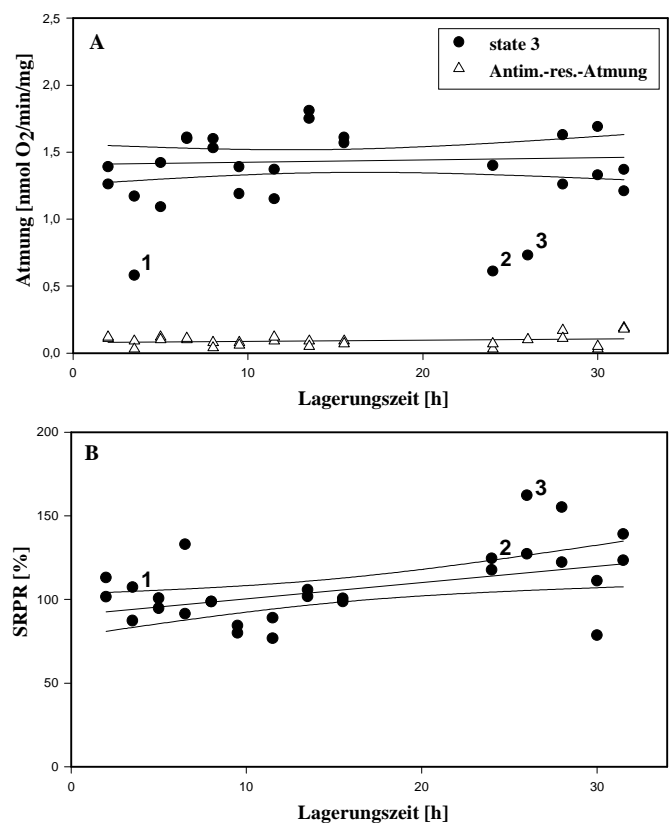
**Abb. 4.9: Ergebnisse der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration versus der Lagerungszeit**

Abb. A zeigt die Veratmung der Substrate 10 mM Pyruvat + 2 mM Malat versus der Lagerungszeit. Angabe der Sauerstoffverbrauchsraten der State 3- und Antimycin-resistenten Atmung in nmol O<sub>2</sub>/mg/min.

Abb. B zeigt die SRPR versus der Lagerungszeit.

Es ergab sich eine signifikante Zunahme mit der Zeit ( $r=0,53$ ,  $p<0.005$ ).

Die Symbole 1,2,3 sind jeweils korrespondierende Einzelinkubationen. Während die Pyruvatatmungsraten in Abb. A weit unterhalb des Mittelwertes liegen, wird durch den Bezug auf die ebenfalls niedrige Succinatatmung in Abb. B deutlich, dass es sich um Fasern mit weniger Mitochondrien handelte.



#### 4.1.7 Pyruvat-abhängige aktive Atmung unter dem Aspekt des Biopsieversandes

Die vorausgehenden Ergebnisse, anhand derer gezeigt werden konnte, dass bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden kein Funktionsverlust der Mitochondrien eintritt, liefern die Grundlage für das Versenden von Biopsieproben über Nacht an ein spezialisiertes Zentrum. Da in der Routinediagnostik aus zeitlichen und materialtechnischen Gründen nicht die Veratmung aller zuvor untersuchten Substrate geprüft werden kann, beschränkt man sich hierbei häufig auf Pyruvat/Malat. Es wurde daher für diese Substrate das Verhalten der State 3-Atmung in Abhängigkeit von der Lagerungszeit unter dem Aspekt des Biopsieversandes separat analysiert. Hierbei ist die Atmung nach 24 Stunden Lagerungszeit von besonderem Interesse, da die zugesandten Proben nach unseren Erfahrungen spätestens 24 Stunden nach Entnahme eintreffen.

In die Analyse wurden die Pyruvat-abhängige State 3-Atmung von fünf Experimenten (wovon vier unter 4.1.1 und eines unter 4.1.6 beschrieben wurden) einbezogen. Wie in Abb. 4.10 und Abb. 4.11 dargestellt, kann der Verlauf der State 3-Atmung durch eine lineare Abhängigkeit von der Zeit beschrieben werden. Anhand des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten ließ sich bei vier Experimenten ein signifikanter Anstieg der Atmungsraten über die Zeit nachweisen ( $p < 0.05$ ). Bei einem Experiment war der Anstieg zwar deutlich, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. Nach 24 Stunden Lagerung wurden Atmungsraten, die 123 %, 135 %, 155 %, 174 % bzw. 188 % der Ausgangswerte betragen, gemessen.

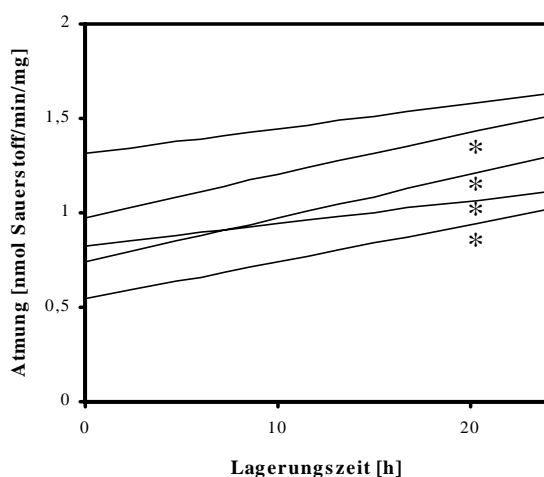


Abb 4.10: Abhängigkeit der State 3-Atmung von der Lagerungszeit (lineare Regression)

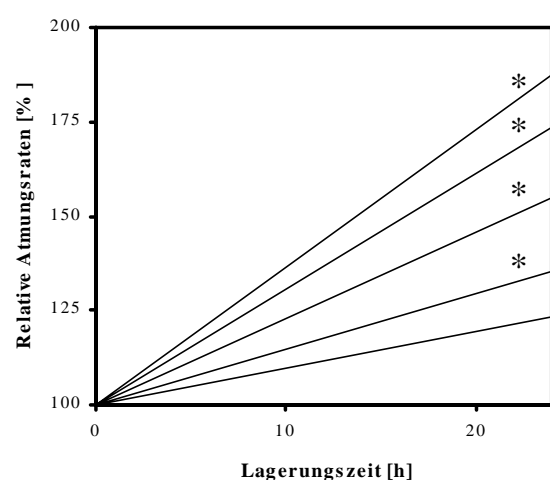


Abb 4.11: Abhängigkeit der normierten State 3-Atmung von der Lagerungszeit (lineare Regression)

Die Messungen erfolgten mit den Substraten 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat in Gegenwart von 2 mM ADP. Die mit \* gekennzeichneten Geraden zeigten einen signifikanten Anstieg über die Zeit ( $p < 0.05$ ).

## 4.2 Stabilität der Mitochondrienfunktion in zugesandten Biopsien

Es wurden 41 in anderen Kliniken entnommene und in das Muskellabor Halle verschickte Biopsien untersucht. Bei diesen Patienten bestand bei unterschiedlichen klinischen Symptomen der Verdacht auf eine mitochondriale Störung. Der Versand der Proben erfolgte tiefgefroren (für die enzymatische Untersuchung) und im eisgekühlten Storagepuffer (für die respirometrische Untersuchung) über Nacht auf dem Postweg. Die Biopsien lagen bei Eintreffen der Proben bis auf eine Ausnahme zwischen 12 und 24 Stunden zurück. Je nach Anforderung wurden respirometrische, enzymatische und histologische Untersuchungen durchgeführt. Bei nachgewiesenen Auffälligkeiten erfolgte später auch die genetische Mutationssuche.

Die respirometrische Untersuchung der Muskelfasern erfolgte ohne Zeitverzögerung. Hierbei wurden die maximalen Atmungsraten für Pyruvat und Succinat gemessen. Die Anwendung der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration mit Einsatz der Hemmstoffe Atraktylat, Antimycin A und Rotenon ermöglicht die Bestimmung der SRPR. Zur Normierung der Pyruvatatmungsraten auf den Mitochondriengehalt wurde als Bezugsgröße das mitochondriale Markerenzym Citratsynthase genutzt. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte spektralphotometrisch in den Homogenaten der bis dahin in flüssigem Stickstoff gelagerten Muskelproben (Zierz et al. 1990; Gellerich et al. 2002). Wegen der variablen Mitochondrienmenge wurden diese Enzymaktivitäten auf die Citratsynthase bezogen.

Die Befunde der zugesandten Proben wurden mit den laboreigenen respirometrischen und enzymatischen Kontrollwerten verglichen. Diese wurden anhand von 47 Biopsien ermittelt, bei denen mitochondriale Myopathien ausgeschlossen werden konnten.

Die respirometrischen und enzymatischen Ergebnisse der zugesandten Biopsien im Vergleich zu den Kontrollbiopsien gibt Tab. 4.6 wieder.

**Tab. 4.6: Bioenergetische Daten von zugesandten Biopsien im Vergleich zu Kontrollen**

Pyruvat - State 3 bei Veratmung von 10mM Pyruvat + 2 mM Malat [nmol O<sub>2</sub>/min/mg]; Pyruvat/CS - auf den Citratsynthesegehalt normierte Pyruvatatmung [pmol O<sub>2</sub>/min/U CS]; SRPR - Succinat bezogene Pyruvatatmung [%]; Atraktylat - Atraktylat-insensitive Atmung [nmol O<sub>2</sub>/min/mg]; CS - Aktivität der Citratsynthase [U/g Eiweiß]; COX, III, I+III, II+III, SDH - Enzymaktivitäten auf Citratsynthase bezogen [%].

Die Pfeile zeigen signifikant (p<0,05) erhöhte oder erniedrigte Werte im Vergleich zu den Kontrollen an.

	Kontrollen (n=47)	Zugesandte Biopsien	
		unauffällige Respirometrie (n=31)	auffällige Respirometrie (n=10)
<b>Respirometrie</b>			
Pyruvat	1,01 ± 0,23	1,2 ± 0,45	0,37 ± 0,29↓
Pyruvat/CS	125,3 ± 29,5	110,2 ± 22,1 ↓	50,4 ± 27,9↓
SRPR	118,7 ± 36,3	106,2 ± 22,4	55,8 ± 31,8↓
Atraktylat	0,25 ± 0,08	0,36 ± 0,15 ↑	0,25 ± 0,20
<b>Enzymaktivitäten</b>			
CS	63,8 ± 16,6	90,9 ± 40,8 ↑	58,3 ± 25,4
COX <sup>s</sup>	103,8 ± 24,7	92,9 ± 24,9	103,3 ± 32,5
Komplex III	155,8 ± 48,5	127,9 ± 34,1	138,4 ± 43,8
Komplex II+III	28,4 ± 8,3	23,8 ± 7,4	23,2 ± 3,4
Komplex I+III	12,8 ± 6,4	9,0 ± 4,8	10,4 ± 7,6
SDH	48,9 ± 13,6	47,7 ± 10,7	47,7 ± 5,9

#### 4.2.1 Zugesandte Biopsien ohne respirometrische Auffälligkeiten

31 der zugesandten Biopsien erfüllten die Kriterien einer sachgemäßen Behandlung und Lagerung und zeigten enzymatisch und histologisch keine Hinweise auf eine mitochondriale Störung. Die entsprechenden respirometrischen Befunde der auf Eis gelagerten Muskelproben waren ebenso unauffällig. Die Atmungsraten und die Enzymaktivitäten lagen innerhalb der Kontrollbereiche. Die maximale Pyruvatatmung sowie die auf die Succinatatmung bezogene Pyruvatatmung, die auf die Citratsynthase-Aktivität bezogenen Aktivitäten der COX, des Komplexes II, der Komplexe II+III, der Komplexe I+II sowie der SDH zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auffällig waren allerdings eine signifikant erhöhte State 4-Atmung und Citratsynthase-Aktivität.

#### 4.2.2 Zugesandte Biopsien mit respirometrischen Auffälligkeiten

Von den zugesandten 41 Proben wurden bei 10 auffällige respirometrische Ergebnisse gefunden. Bei 7 dieser auffälligen Biopsien gab es eindeutige Belege dafür, dass die Kriterien für eine sachgemäße Entnahme, Behandlung oder Lagerung nicht erfüllt waren. Die Werte sind im Einzelnen in der Tab. 4.7 aufgeführt.

**Tab. 4.7: Respirimetrisch auffällige Biopsien mit Entnahmefehlern oder Transportschäden**

Biopsie-Nr.: - Eingangsnummer der zugeschickten Biopsien; Pyruvat - State 3 bei Veratmung von 10mM Pyruvat + 2mM Malat [nmol O<sub>2</sub>/min/mg]; Pyruvat/CS - auf den Citratsynthasegehalt normierte Pyruvatatmung [pmol O<sub>2</sub>/min/UCS]; SRPR - Succinat bezogene Pyruvatatmung [%]; Atraktylat - Atraktylat-insensitive Atmung [nmol O<sub>2</sub>/min/mg]; CS - Aktivität der Citratsynthase [U/g Eiweiß]; COX, III, I+III, II+III, SDH - Enzymaktivitäten auf % Citratsynthase bezogen [%]. n.m. = nicht messbar; n.g. = nicht gemessen.

Biopsie-Nr.	575	2093	269	1640	265	2079	345
<b>Respirometrie</b>							
Pyruvat	0,03	0,08	0,16	0,14	0,50	0,60	0,16
Pyruvat/CS	33,0	80,0	44,4	21,0	113,0	38,0	22,5
SRPR	75,0	89,0	0,2	24,0	67,6	47,0	n.g.
Atraktylat	0,03	0,05	0,20	0,39	0,30	0,53	0,06
<b>Enzymaktivitäten</b>							
CS	33,2	27,0	60,9	64,9	45,2	98,1	59,0
COX	22,0	76,0	128,0	86,8	138,6	98,1	62,9
K. III	n.m.	216,0	182,6	123,7	n.g.	117,9	139,7
K. II+III	n.m.	22,4	32,0	26,3	21,8	24,5	15,4
K. I+III	3,3	12,0	6,0	19,3	4,5	5,1	12,6
SDH	n.m.	52,0	54,7	40,8	43,2	42,5	43,5

Die versandten Proben 575 und 2093 bestanden im wesentlichen aus Fett- und Bindegewebe, erkennbar an den äußerst niedrigen Atmungsraten und dem niedrigen Mitochondriengehalt, was an der niedrigen Citratsynthase-Aktivität deutlich wurde. Eine sinnvolle Diagnostik war hier nicht möglich.

Die Biopsieproben 269 und 1640 erreichten das Labor im gefrorenen Zustand. Auch hier fielen ausgesprochen niedrige Atmungsraten auf, obwohl der Mitochondriengehalt im Normalbereich lag.

Die Biopsie 265 wurde erst zwei Tage nach Entnahme im aufgetauten Zustand erhalten. Die aktiven Atmungsraten waren deutlich erniedrigt.

Die von den Kontrollwerten abweichende Befunde der Proben 2079 und 345 sind mit Fehlern bei der Probenaufbereitung zu erklären. Beide Proben wurden nach Entnahme über eine Stunde bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Überführen in Storagepuffer sowie die Kühlung wurden versäumt. Bei der Probe 345 war die extrem erniedrigte Pyruvatatmung auffällig, während diese bei der Probe 2079 nur mäßig reduziert war.

Bei drei der Biopsien mit auffälligen respirometrischen Befunden ließen sich keine Entnahmefehler oder Transportschäden eruieren. Als Erklärung für die Funktionsstörungen sind mitochondriale Defekte oder eine zeitliche Instabilität in Betracht zu zie-

hen. In der Tab. 4.8 wurden die Ergebnisse der respirometrischen, enzymatischen und histologischen Untersuchungen dieser Biopsien aufgeführt.

**Tab. 4.8: Respirometrisch auffällige Biopsien ohne Transportschäden**

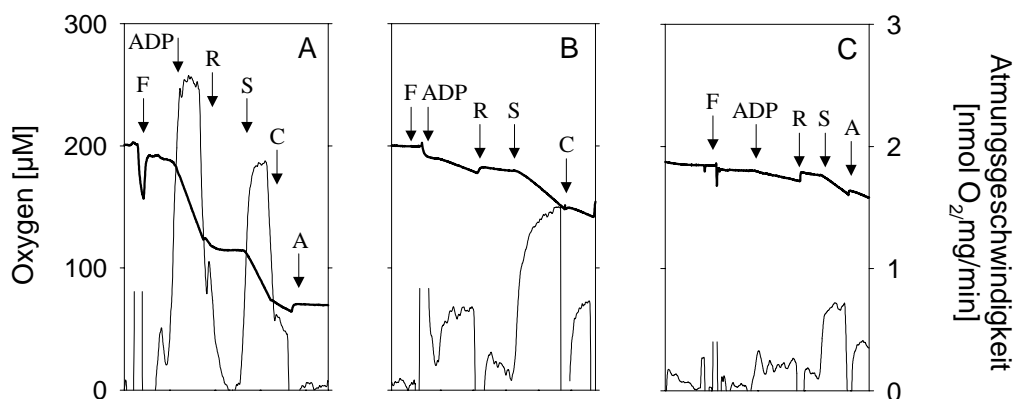
Biopsie-Nr: - Eingangsnummer der zugeschickten Biopsien; Pyruvat - State 3 bei Veratmung von 10mM Pyruvat + 2mM Malat [nmol O<sub>2</sub>/min/mg]; Pyruvat/CS - auf den Citratsynthasegehalt normierte Pyruvatatmung [pmol O<sub>2</sub>/min/UCS]; SRPR - Succinat bezogene Pyruvatatmung [%]; Atraktylat - Atraktylat-insensitive Atmung [nmol O<sub>2</sub>/min/mg]; CS - Aktivität der Citratsynthase [U/g Eiweiß]; COX, III, I+III, II+III, SDH - Enzymaktivitäten auf % Citratsynthase bezogen [%].

Biopsie-Nr.	1555	1892	229
<b>Respirometrie</b>			
Pyruvat	0,80	0,74	0,49
Pyruvat/CS	96,4	93,7	61,3
SRPR	44,0	70,5	36,5
Atraktylat	0,63	0,24	0,16
<b>Enzymaktivitäten</b>			
CS	59,9	79,2	65,6
COX	126,5	55,7	125,0
K. III	137,5	92,4	110,0
K. II+III	27,7	17,7	25,0
K. I+III	24,8	9,2	6,6
SDH	56,8	49,4	42,5
<b>Histologie</b>	geringgradig myopathisches Gewebssyndrom mit spärlichen mitochondrialen Anomalien, vereinzelt ragged-red-Fasern, sekundärer Lipidakkumulation	unspezifische pathologische Veränderungen (atrophische Fasern, Einzelfasernekrosen)	eingeschränkte Beurteilbarkeit durch Artefakte - unspezifische pathologische Veränderungen (teiltraphische Fasern, Infiltrat)

Bei allen drei Proben wurde eine deutlich verminderte SRPR gemessen, was auf eine Komplex I-abhängige Störung hindeutet. Bei der Biopsie 1555 befanden sich alle gemessenen Enzymaktivitäten im Normbereich, der histologische Befund legte jedoch den Verdacht auf ein myopathisches Syndrom nahe. Ursächlich für die Komplex I-Störung könnte ein nicht erfasster Enzymdefekt, z.B. der Pyruvatdehydrogenase sein. Bei der Biopsie 1892 ließen sich ein deutliches COX-Defizit sowie histologisch unspezifische pathologische Veränderungen, die mit einer Critical-Illness-Myopathie vereinbar wären, nachweisen. Für Critical-Illness-Myopathien sind Komplex I-Störungen beschrieben (Gellerich et al. 2002). Dies könnte damit Ursache für die gefundenen pathologischen Atmungsraten bei dieser Biopsie sein. Die Aktivität der Citratsynthase lag im oberen Grenzbereich der Norm, was durch eine kompensatorische Mitochondrienvermehrung bedingt sein könnte. Da es sich hierbei um Muskelmaterial aus dem M.

gastrocnemius handelte, läßt sich die erhöhte Citratsynthase möglicherweise auch auf den höheren Mitochondriengehalt dieses Muskels im Vergleich zum bei den Kontrollen meist verwendeten *M. vastus* zurückführen. Die Probe 229 wies enzymatisch keine Auffälligkeiten auf. In der histologischen Untersuchung fanden sich unspezifische pathologische Veränderungen, die aufgrund der zahlreichen Artefakte keine weitere Beurteilung zuließen. Letztlich mußte in diesem Fall die Ursache für die pathologischen Atmungsraten offen bleiben. Es konnte nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden, ob es sich hierbei um eine primäre mitochondriale Störung oder um einen Alterungsprozess durch die protrahierte Lagerung handelte.

Die respirometrische Untersuchung von zugeschickten Biopsien ist in Abb. 4.12 beispielhaft dargestellt.



**Abb. 4.12: Respirometrische Messung der Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern von drei zugesandten Biopsien**

Die Untersuchung der mitochondrialen Funktion erfolgte mit dem Prinzip der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration. Substrate: 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat. Durch Pfeile bezeichnete Zusätze: F - permeabilisierte Fasern; ADP - 2mM ADP; R - 10  $\mu$ M Rotenon; S - 10 mM Succinat; C - 50 $\mu$ M Atraktolat; A - 10 $\mu$ M Antimycin A. Die obere Kurve stellt die Sauerstoffkonzentration [ $\mu$ M] in der Messkammer dar (linke Ordinate). Die untere Kurve zeigt die auf Feuchtgewicht bezogene Atmungsgeschwindigkeit [ $\text{nmol O}_2/\text{min/mg Feuchtgewicht}$ ] (rechte Ordinate).

A: Unter optimalen Transportbedingungen zugesandte Biopsie. Die Mitochondrien zeigen eine normale Pyruvat-abhängige und Succinat-abhängige State 3-Atmung bei normaler Rotenon-Hemmung sowie Antimycin-resistenter Atmung. Die Atraktolat-insensitive Atmung scheint jedoch erhöht zu sein.

B: Biopsie mit 48-stündiger Transportzeit (=Biopsie 265, vgl. Tab. 4.7). Die Pyruvatatmung war deutlich erniedrigt, bei guter Succinatatmung. Die Atraktolat-insensitive Atmung war erhöht.

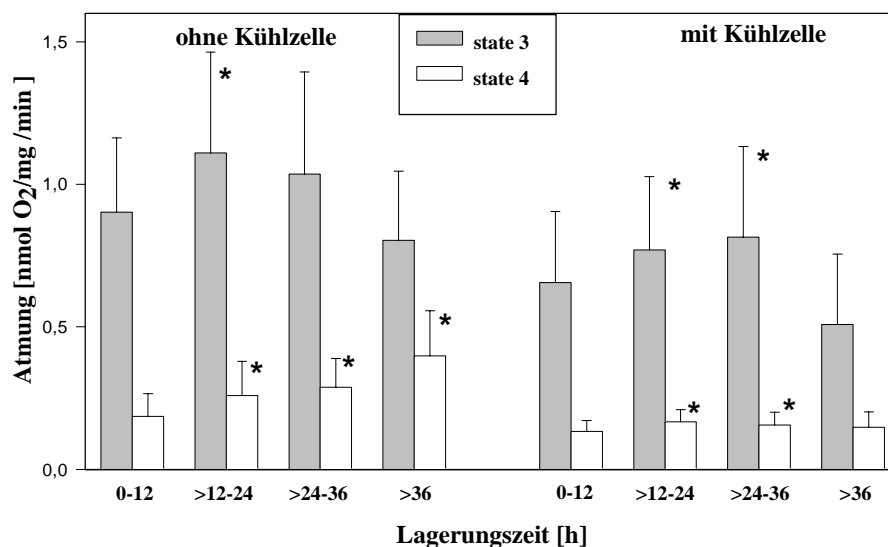
C: Im gefrorenen Zustand eingegangene Biopsie (=Biopsie 1640, vgl. Tab. 4.7). Die aktiven Atmungsraten waren deutlich erniedrigt, wobei die Pyruvatatmung stärker vermindert war als die Succinatatmung.

### 4.3 Optimierung der Messmethode

#### 4.3.1 Kühlung des gelagerten Muskelmaterials

Die Lagerungsexperimente wurden aus technischen Gründen unter verschiedenen Laborbedingungen durchgeführt. Zunächst - vor Einrichtung des Kühlraumes - erfolgte die Präparation der Fasern auf Eis bei Zimmertemperatur. Damit wurde das gesamte Muskelmaterial während der Lagerung bis zur Messung wiederholt erwärmt. Auch der Vorgang des Permeabilisierens der einzelnen Muskelproben erfolgte bei Zimmertemperatur. Nach Einrichtung eines begehbaren Kühlraumes konnten alle Arbeiten an den Fasern außer der eigentlichen Untersuchung im Oxygraphen bei 4 °C ausgeführt und eine Erwärmung des gelagerten Muskelmaterials konsequent vermieden werden.

In Abb. 4.13. wurden die Langzeitexperimente in Abhängigkeit vom Kühlregime in zwei Gruppen zusammengefasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der State 3- und State 4-Atmungen aller Experimente einer Gruppe.



**Abb. 4.12: Vergleich der spezifischen Atmungsgeschwindigkeiten permeabilisierter Muskelfasern in Abhängigkeit von Lagerungszeit und -bedingungen**

Substrate: 10 mM Pyruvat + 2 mM Malat. Atmungsgeschwindigkeiten in nmol O<sub>2</sub>/min/mg aus  $\bar{x} \pm SD$ .

n = 14-62 pro Gruppe. \*= signifikante Unterschiede (p < 0.05) bezogen auf den Ausgangswert (Lagerung 0-12 h), separat für jede Gruppe. Die State 3-Atmungsraten zeigten in beiden Gruppen einen Anstieg bei einer Lagerung bis 36 Stunden und fielen bei längerer Lagerung unter die Basiswerte ab. Bei der Gruppe der nicht durchgehend gekühlten Muskelfasern fiel ein deutlicher Anstieg der State 4-Atmung über die Lagerungszeit auf, während bei der Gruppe der optimal gelagerten Muskelfasern die State 4-Atmungsraten nach über 36 Stunden Lagerung nicht höher als die Ausgangswerte waren.



Die State 3-Werte zeigten in beiden Gruppen das gleiche, schon beschriebene Verhalten über die Zeit mit einem leichten Anstieg bei Lagerung bis zu 36 Stunden, um dann unter den Ausgangswert abzufallen. Auffällig waren die höheren Werte der Sauerstoffverbrauchsrate in der nicht durchgehend gekühlten Gruppe, die jedoch zufälliger Natur sein müssen.

Bei der Gruppe der nicht durchgehend gekühlten Muskelfasern fielen stark ansteigende Atraktolat-insensitive Atmungsrate im Verlauf der Lagerung auf. In der optimal gelagerten Gruppe zeigten sich im Zeitverlauf deutlich geringere Anstiege.

Die RCI-Werte (Werte nicht gezeigt) waren in den ersten beiden Zeitabschnitten unabhängig von den Messbedingungen annähernd konstant. Nach über 36 Stunden Lagerung zeigte sich der Einfluss der Kühlketten-Unterbrechung, der RCI fiel um 29 % ab, während er unter optimalen Bedingungen konstant blieb.

Die Antimycin-insensitive Atmungen (Werte nicht gezeigt) in der optimal gekühlten Gruppe zeigten während der gesamten Lagerungszeit keine Veränderungen. Die Leak-Atmung (Werte nicht gezeigt) war über die Zeit bei diesen Messungen ebenfalls stabil. Bei den Experimenten mit unterbrochener Kühlkette zeigten zwei Experimente bei stabiler Antimycin-insensitiver Atmung einen deutlichen Anstieg der Leak-Atmung.

Die unterschiedlichen Kühlregime hatten anscheinend keinen Einfluss auf die Stabilität der Atmung während der State 3-Phase (Werte nicht gezeigt). Auffällig war in der zweiten oder dritten Zeitperiode unabhängig vom Kühlregime eine regelmäßig zu findende Abnahme der zeitlichen Stabilität. Nach über 36 Stunden Lagerung dagegen war die Atmung in allen Fällen stabiler als in den Kontrollmessungen.

#### **4.3.2 Konservierung der Mitochondrienfunktion mit Storagepufferzusätzen**

Um die zeitliche Stabilität der Mitochondrienfunktion bei der Lagerung im Storagepuffer zu verlängern, wurden dem Standard-Storagepuffer Proteinase-Inhibitoren und ein Antibiotikum zugesetzt. Das Muskelmaterial einer Biopsieprobe wurde geteilt und in den beiden verschiedenen Storagepuffern gelagert. Zum Vergleich der mitochondrialen Funktion in Abhängigkeit vom verwendeten Storagepuffer wurde die Veratmung verschiedener Substrate untersucht. Die jeweils korrespondierenden Mittelwerte aus den Einzelmessungen sind in der folgenden Tab. 4.11 aufgeführt.

**Tab. 4.11: Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern in Abhängigkeit vom verwendeten Storagepuffer**

Substrate: 10 mM Pyruvat + 2 mM Malat; 10 mM Succinat; 10 mM Glutamat + 2 mM Malat; 1mM Octanoylcarnitin + 2 mM Malat; 0,025 mM Palmitoylcarnitin + 2 mM Malat. *State 3* – aktive Atmung; *State 4* – Atraktolat-insensitive Atmung; *Anti.-ins.-At.* – Antimycin-insensitive Atmung; *RCI* – Respiratorischer Kontrollquotient. Atmungsgeschwindigkeiten in  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg} \pm \text{SD}$ . Storage-Puffer I: Standard-Storage-Puffer; Storage-Puffer II: Standard-Storage-Puffer mit Zusatz von Proteinase-Inhibitoren und Antibiotikum. Mittelwerte  $\pm \text{SD}$  aus 4 Einzelbestimmungen. Spalte [%]: relative Änderung der Atmungsraten im Vergleich zum Standard-Storagepuffer [=100%].

Substrat	State 3	[%]	State 4	[%]	Anti.-ins.-At. [%]	RCI	[%]
<b>Pyruvat/Malat</b>							
Storagepuffer I	0,51 $\pm$ 0,13	[100]	0,17 $\pm$ 0,04	[100]	0,09 $\pm$ 0,02	[100]	3,00 $\pm$ 0,29 [100]
Storagepuffer II	0,88 $\pm$ 0,24	[173]	0,31 $\pm$ 0,06	[182]	0,16 $\pm$ 0,04	[178]	2,85 $\pm$ 0,37 [95]
<b>Succinat</b>							
Storagepuffer I	0,62 $\pm$ 0,15	[100]	0,21 $\pm$ 0,08	[100]	0,10 $\pm$ 0,03	[100]	3,17 $\pm$ 0,57 [100]
Storagepuffer II	0,77 $\pm$ 0,19	[124]	0,29 $\pm$ 0,08	[138]	0,19 $\pm$ 0,05	[90]	2,71 $\pm$ 0,72 [85]
<b>Glutamat/Malat</b>							
Storagepuffer I	0,56 $\pm$ 0,19	[100]	0,23 $\pm$ 0,08	[100]	0,12 $\pm$ 0,01	[100]	2,44 $\pm$ 0,13 [100]
Storagepuffer II	0,80 $\pm$ 0,18	[143]	0,33 $\pm$ 0,05	[143]	0,22 $\pm$ 0,04	[183]	2,48 $\pm$ 0,35 [102]
<b>Pal.carnitin/Malat</b>							
Storagepuffer I	0,38 $\pm$ 0,04	[100]	0,14 $\pm$ 0,04	[100]	0,10 $\pm$ 0,05	[100]	3,07 $\pm$ 1,40 [100]
Storagepuffer II	0,58 $\pm$ 0,10	[153]	0,20 $\pm$ 0,03	[143]	0,18 $\pm$ 0,07	[180]	2,87 $\pm$ 0,32 [93]
<b>Oct.carnitin/Malat</b>							
Storagepuffer I	0,56 $\pm$ 0,11	[100]	0,17 $\pm$ 0,04	[100]	0,10 $\pm$ 0,03	[100]	3,36 $\pm$ 0,46 [100]
Storagepuffer II	0,76 $\pm$ 0,14	[136]	0,28 $\pm$ 0,07	[165]	0,20 $\pm$ 0,05	[200]	2,88 $\pm$ 0,83 [86]

Es wird deutlich, dass die State 3-Atmung unter Verwendung des variierten Storagepuffers auf bis zu 173 % des im Standardpuffers ermittelten Kontrollwertes anstieg. Auffällig war jedoch, dass die Atraktolat-insensitive Atmung bei allen durchgeführten Experimenten deutlich höher als in der Kontrollgruppe (bis maximal 182 %) ausfiel. Auch die Antimycin-Hemmung war unter Verwendung des neuen Puffers deutlich schlechter als unter standardisierten Bedingungen. Insgesamt deuteten die Ergebnisse auf eine schlechtere Konservierung der mitochondrialen Funktion bei Lagerung des Muskelmaterials im variierten Storagepuffer hin.

### 4.3.3 Lagerung des Muskelmaterials im permeabilisierten Zustand

Zur Prüfung der zeitlichen Stabilität der mitochondrialen Eigenschaften bei Lagerung permeabilisierter Muskelfasern wurde das Muskelmaterial von jeweils drei Biopsieproben nach Permeabilisierung im eisgekühlten Storagepuffer gelagert und stündlich unter-

sucht. Sofort nach der Permeabilisierung wurde eine Doppelmessung durchgeführt. Die Werte wurden als Kontrollwerte betrachtet. Die Lagerungszeit wurde in drei Abschnitte aufgeteilt. Die Ergebnisse sind zusammengefasst für jedes Experiment in der Tab. 4.10 aufgeführt.

**Tab. 4.10: Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern bei Lagerung im permeabilisierten Zustand im Storagepuffer in Abhängigkeit von der Lagerungszeit**

Substrate: 10 mM Pyruvat + 2 mM Malat; 10 mM Succinat. Spalte [%]: relative Änderung der Werte im Vergleich zur Kontrolle. LZ – Lagerungszeit; n – Anzahl der Einzelinkubationen; State 3 – aktive Atmung; State 4 – Atraktat-insensitive Atmung; RCI – Respiratorischer Kontrollquotient. Atmungsgeschwindigkeiten in  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg} \pm \text{SD}$ .

Substrate/LZ	n	State 3	[%]	State 4	[%]	RCI	[%]
<b>Pyruvat/Malat</b>							
Kontrolle	2	0,81 ± 0,01	[100]	0,24 ± 0,06	[100]	3,56±0,99	[100]
1-4 h	4	0,89 ± 0,05	[110]	0,22 ± 0,05	[92]	4,20±1,10	[118]
>4-7 h	3	1,33 ± 0,28	[164]	0,14 ± 0,01	[58]	9,21±1,31	[259]
>7-10 h	3	1,31 ± 0,16	[162]	0,14 ± 0,02	[58]	9,38±0,34	[263]
<b>Succinat</b>							
Kontrolle	2	0,69 ± 0,11	[100]	0,25 ± 0,01	[100]	2,81±0,38	[100]
1-4 h	4	1,06 ± 0,19	[154]	0,25 ± 0,07	[100]	4,50±1,50	[160]
>4-7 h	3	1,27 ± 0,16	[184]	0,19 ± 0,04	[76]	6,89±1,86	[245]
>7-10 h	3	1,22 ± 0,20	[177]	0,19 ± 0,02	[76]	6,53±0,53	[233]
<b>Pyruvat/Malat</b>							
Kontrolle	2	1,11±0,22	[100]	0,19±0,04	[100]	5,97±0,04	[100]
1-4 h	4	1,03±0,10	[93]	0,19±0,02	[100]	5,46±0,53	[91]
>4-7 h	3	1,20±0,22	[108]	0,23±0,06	[121]	5,19±0,62	[87]
>7-10 h	3	1,14±0,15	[103]	0,23±0,06	[121]	5,20±1,08	[87]
<b>Succinat</b>							
Kontrolle	2	0,82±0,18	[100]	0,24±0,02	[100]	3,52±1,07	[100]
1-4 h	4	0,81±0,11	[99]	0,18±0,04	[75]	4,75±1,09	[135]
>4-7 h	3	0,93±0,21	[113]	0,21±0,13	[88]	4,45±0,79	[126]
>7-10 h	3	0,89±0,25	[109]	0,17±0,06	[71]	5,41±0,64	[154]
<b>Pyruvat/Malat</b>							
Kontrolle	2	0,97±0,06	[100]	0,12±0,01	[100]	8,07±0,42	[100]
1-4 h	4	0,54±0,026	[56]	0,13±0,03	[108]	4,37±1,99	[54]
>4-7 h	3	0,41±0,11	[42]	0,15±0,02	[125]	2,71 ± 0,93	[34]
>7-10 h	3	0,30±0,14	[31]	0,08±0,03	[67]	3,83 ± 1,19	[47]
<b>Succinat</b>							
Kontrolle	2	0,64±0,14	[100]	0,12±0,03	[100]	5,63±2,51	[100]
1-4 h	4	0,52±0,14	[81]	0,15±0,04	[125]	3,45±0,08	[61]
>4-7 h	3	0,37±0,06	[58]	0,12±0,02	[100]	3,15±0,84	[56]
>7-10 h	3	0,37±0,05	[58]	0,12±0,03	[100]	3,26±0,68	[58]

Bei Lagerung der ersten Muskelprobe stieg die State 3-Atmung während der Lagerung stark gegenüber dem Kontrollwert an, maximal wurden 164 % (Pyruvat) bzw. 184 % (Succinat) erreicht. Da die kontrollierte Atmung im Laufe der Lagerung sogar noch einen Abfall zeigte, war ein starker Anstieg des RCI für beide untersuchten Substrate zu

beobachten. Hinweise für eine erhöhte Leak-Atmung gab es nicht (Werte nicht gezeigt). Bei der Lagerung der zweiten Muskelprobe war dagegen keine tendenzielle Veränderung der Atmungsgeschwindigkeiten zu erkennen. Die RCI-Werte nahmen für die Pyruvatatmung ab und für die Succinatatmung zu. Bei der Lagerung der dritten Muskelprobe erwies sich die State 3-Atmung als nicht stabil. Die State 4-Atmung nahm relativ schwach ab, so dass auch die RCI-Werte mit der Lagerungszeit für beide untersuchten Substrate abnahmen.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass das Verhalten der zeitlichen Stabilität der Atmung individuelle Unterschiede aufwies und dabei substratunabhängig schien.

## 5 Diskussion

### 5.1 Detektion mitochondrialer Defekte

Über die mitochondrialen Enzephalomyopathien hinaus rücken die Mitochondrien zunehmend in den Mittelpunkt pathophysiologischer Betrachtungen. Die Zahl der Erkrankungen, bei denen defekte Mitochondrien nachgewiesen wurden, ist inzwischen kaum noch überschaubar. Die zunehmende Bedeutung der Diagnostik und der Erforschung der Ursachen mitochondrialer Defekte erfordern sichere und ethisch vertretbare Untersuchungsmethoden. Neben dem klinischen Bild liefern nichtinvasive Verfahren, wie die laborchemische Laktatbestimmung in Körperflüssigkeiten sowie die Messung von Laktat, ATP und Kreatinphosphat mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wertvolle Hinweise auf das Vorliegen mitochondrialer Defekte. Zur weiterführenden Diagnostik und metabolischen Lokalisierung des Defektes ist jedoch eine Muskelbiopsie erforderlich. Während dies bei mitochondrialen Enzephalomyopathien als etabliert gilt, ist die Aussagekraft der Untersuchung von Muskelmaterial als extrazerebrales Gewebe bei mit vermutlich mitochondrialen Funktionsstörungen assoziierten neurodegenerativen Erkrankungen umstritten. Jedoch gibt es Hinweise, dass der bei Morbus Parkinson post mortem in der Pars compacta der Substantia nigra gefundene Komplex I-Defekt auch im Muskel betroffener Patienten nachweisbar ist (Reichmann und DiMauro 1998).

Anhand der enzymatischen Bestimmung mitochondrialer Enzyme in Biopsieproben kann die molekulare Ursache des mitochondrialen Defektes erkannt werden. Die Untersuchung der oxidativen Phosphorylierung als Gesamtprozess sowie die Korrelation des molekularen Defektes mit Veränderungen am metabolischen System, welche den klinischen Zustand des Patienten bestimmen, gelingt jedoch nur mit funktionellen Untersuchungen. Das Schwellenwertphänomen (Thresholdeffekt) von Enzymaktivitätsveränderungen ist eine Folge unterschiedlicher Kontrolleigenschaften der betroffenen Enzyme auf das metabolische System (Mazat et al. 1993). Es ist schwer vorherzusagen, in welchem Ausmaß sich eine bestimmte Enzymaktivitätsveränderung auf den Stoffwechsel und den klinischen Zustand des Patienten auswirkt. So gibt es Patienten mit beträchtlich verminderter Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität ohne klinische Auffälligkeiten (Mazat et al. 1993). Bei manchen Defekten sind nur die kinetischen Eigenschaften beeinträchtigt, während die Maximalaktivitäten unverändert bleiben (Bernsen 1991). Die

methodischen Grundlagen für die funktionellen Untersuchungen liefert die metabolische Kontrolltheorie (Gellerich et al. 1983 und 1990; Wisniewski et al. 1993; Letellier et al. 1993). Diese beschreibt mit mathematischen Mitteln den Zusammenhang zwischen der Aktivität eines einzelnen Enzymes und seinem Beitrag zur Flusskontrolle durch das metabolische System.

Bei der funktionellen Untersuchung der oxidativen Phosphorylierung findet die hochauflösende Respirometrie Anwendung. Aufgrund der Abhängigkeit der Kontrolleigenschaften von Enzymen von den Messbedingungen wäre eine funktionelle Untersuchung mit intakten Zellen ideal. Da die Zellmembran jedoch für viele Effektoren der oxidativen Phosphorylierung nicht permeabel ist, müssen die Untersuchungen an isolierten Mitochondrien oder permeabilisierten Muskelfasern durchgeführt werden. Üblicherweise wurden die Untersuchungen der mitochondrialen Funktion bisher an isolierten Mitochondrien vorgenommen. Da bei dieser Methode bis zu 90 % Präparationsverluste auftreten, wird hierfür eine große Muskelmaterialmenge benötigt. Darüber hinaus besteht die Gefahr der präparationsbedingten Auswahl spezieller Mitochondrien-Subpopulationen, da sich das Sedimentationsverhalten von alterierten Mitochondrien verändern kann. So gibt es Hinweise, nach denen sich subsarkolemmale und interfibrilläre Mitochondrien in ihren Eigenschaften und ihrer Empfindlichkeit für pathologische Änderungen unterscheiden (Palmer et al. 1985; Lesnefsky und Hoppel 2003).

Aufgrund dieser Nachteile wurde als Alternative die Skinned fiber-Technik (Kunz et al. 1993; Veksler et al. 1987; Letellier et al. 1992; Saks et al. 1998) entwickelt. Die Anwendung chemisch permeabilisierter Fasern und Zellen erlaubt es, die Mitochondrien direkt in den Biopsieproben in situ zu untersuchen. Da Präparationsverluste wegfallen, weist die Methode eine deutlich höhere Empfindlichkeit auf. Es wurde nachgewiesen, dass im Durchschnitt 90 % der ursprünglich in der Zelle vorhandenen Mitochondrien später im respirometrischen Messansatz messbar sind (Kunz et al. 1993). Dies ist die Grundlage für die Analyse der mitochondrialen Funktion in sehr kleinen Gewebeproben als Bestandteil der Routinediagnostik. Außerdem bleiben die Mitochondrien intakt. So konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Cytochrom c nur geringe Atmungssteigerungen bewirkt, was eine weitgehende Intaktheit der mitochondrialen Außenmembran belegt (Kay et al. 1997; Saks et al. 1998, Toleikis et al. 1996; Gellerich 2002). Darüber hinaus fanden Kunz et al. sowie Tonkonogi et al., dass nach der Permeabilisation weni-

ger als 4 % der Citratsynthase frei gesetzt wurden, was für eine hohe Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran spricht (Kunz et al. 1993; Tonkonogi et al. 1998). Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen belegen die weitgehende morphologische Intaktheit der permeabilisierten Fasern (Letellier et al. 1992). Durch die Verwendung von permeabilisierten Muskelfasern ergibt sich zudem die Möglichkeit, komplexe Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellorganellen, wie z.B. den Koffeineffekt, zu untersuchen (Kunz et al. 1993). Der Zusatz von Koffein zu permeabilisierten Muskelfasern bewirkt via Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors eine Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Dies führt wiederum zur Kontraktion der Calcium-sensitiven Myosin-ATPase als ATP-verbrauchender Prozess, der die Atmung stimuliert.

Das Hauptproblem bei der Untersuchungen der Mitochondrienfunktion ist deren zeitliche Instabilität. Eine weitere Schwierigkeit bei der Verwendung der Skinned fiber-Technik ergibt sich aus den unterschiedlichen Mitochondriengehalten der Fasern (Mikroheterogenitäten).

## **5.2 Stabilität der Mitochondrienfunktion in Muskelfasern**

Die Untersuchungen zur zeitlichen Stabilität von isolierten Mitochondrien zeigten eine deutliche Instabilität bei Lagerung (Scholte et al. 1997). Isolierte Mitochondrien schwellen in den üblicherweise verwendeten Medien an (Wrogemann et al. 1985). Durch den Zusatz von Makromolekülen kann diese Schwellung verhindert werden, dennoch weisen die durch den Präparationsstress ohnehin mehr oder weniger geschädigten Mitochondrien nur eine sehr begrenzte funktionelle Stabilität von fünf bis sechs Stunden auf (Gellerich et al. 1994; Scholte et al. 1997)

Über die Stabilität der Mitochondrienfunktion in Muskelfasern existierten bisher keine ausreichend validierten Daten. In einer Arbeit von Letellier (Letellier et al. 1992) wurde eine funktionelle Stabilität von Mitochondrien in Muskelfasern bis zu drei Stunden in eisgekühltem Storagepuffer erwähnt. Skladal et al. beschrieben 1994 eine Aufrechterhaltung der Funktion von Mitochondrien in Skelettmuskelfasern bis zu 30 Stunden bei Lagerung in Medien mit hohem Gehalt an ATP und Kreatinphosphat (Skladal et al. 1994).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Stabilität von „normalen“ Mitochondrien untersucht. In Ermangelung von Muskelbiopsien von neurologisch unauffälligen Patienten wurde auf Muskelproben von orthopädischen Patienten zurückgegriffen. Diese wiesen zwar klinisch keine myologischen Auffälligkeiten auf, dennoch muss anhand der Hinweise aus der Literatur kritisch hinterfragt werden, ob diese Patienten wirklich als Kontrollpopulation mit unauffälliger Mitochondrienfunktion gelten können. Brierley et al. konnten 1996 zeigen, dass reduzierte körperliche Aktivität in Verbindung mit dem Altern von verminderten Aktivitäten der Atmungsketten-Enzyme begleitet wird (Brierley et al. 1996). Dies könnte bei orthopädischen Patienten, die mit einer Hüft-Endoprothese versorgt werden, durchaus eine Rolle spielen. In einer Arbeit von Gonzalez-Crespo et al. wurde der muskuläre Stoffwechsel von älteren Patienten, die sich eine Hüftfraktur zugezogen hatten, untersucht (Gonzalez-Crespo et al. 1999). Es wurden auch hier deutlich erniedrigte Aktivitäten der Atmungsketten-Enzyme gefunden. Allerdings waren diese Veränderungen milde ausgeprägt und führten zu keiner kompensatorischen Proliferation der Mitochondrien. Darüber hinaus fanden sich Auffälligkeiten in Form erniedrigter Carnitin-Spiegel und histochemischer Veränderungen, wie Ragged-red-Fasern.

Es wurde die Möglichkeit der Lagerung von Muskelfasern in einem Storagepuffer zum Zwecke der späteren Durchführung oxygraphischer Messungen mit permeabilisierten Muskelfasern geprüft. Dazu wurden Muskelproben von 13 Patienten über 48 Stunden bis zur Untersuchung auf Eis gelagert. Das Muskelmaterial wurde bei Endoprothesenimplantationen in Hüft- oder Kniegelenke von Patienten ohne myopathologische Auffälligkeiten in der orthopädischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gewonnen. Vor der Lagerung wurden die Muskelproben grob zerfasert, während die mechanische Permeabilisierung der Fasern mit Nadeln und die chemische Permeabilisierung mit Saponin erst unmittelbar vor der Messung erfolgte. Für die Substrate Pyruvat/Malat, Succinat, Glutamat/Malat, Pamitoylcarnitin/Malat und Octanoylcarnitin/Malat wurden in jeweils verschiedenen Langzeitexperimenten die State 3-Atmung, die durch Atraktolat-hemmbar Atmung (State 4) sowie die Antimycin-resistente Atmung unter identischen Bedingungen wiederholt über die gesamte Lagerungszeit gemessen.



Die aktiven Atmungsraten zeigten bei allen Experimenten ähnliche lagerungszeitabhängige Veränderungen. Von einem individuell unterschiedlichem Ausgangsniveau stiegen die Atmungsraten mit progressiver Lagerung zunächst an, wobei zwischen 24 und 36 Stunden die Maximalwerte erreicht wurden, um sich mit fortschreitender Lagerung wieder dem Ausgangsniveau zu nähern. Ein Abfall unter das Ausgangsniveau wurde bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden nicht beobachtet.

Die Ursachen für das Ansteigen der aktiven Atmung nach 12 Stunden Lagerung im Storagepuffer sind unklar. Möglicherweise führt die Lagerung zu einer zunehmenden Fragilität des Sarkolemm, was beim Saponinaufschluss zu einer verbesserten Zugänglichkeit der Mitochondrien führen könnte. Das würde aber bedeuten, dass der Saponin-Aufschluss ohne Lagerung nicht vollständig wäre.

Während der Lagerung kommt es zu einer erkennbaren ödematösen Verquellung der Muskelbündel. Möglicherweise lassen diese verquollenen Muskelbündel eine feinere Präparation der Muskelfasern und damit auch eine bessere Diffusion des zugesetzten Saponins zu der einzelnen Zelle zu. Die Zugänglichkeit der Substrate zu den Mitochondrien wäre infolge dessen verbessert, was ein Ansteigen der aktiven Atmung erklären könnte. Für diese Argumentation gibt es einige Hinweise, denn Toleikis et al. sind der Ansicht, dass für eine vollständige Permeabilisierung von Muskelfasern eine Mischung aus Saponin und Kollagenase nötig sei (Toleikis et al. 1996). Diese Befunde konnten bei Untersuchungen in unserem Muskellabor jedoch nicht bestätigt werden (Trumbekaité und Gellerich, unveröffentlicht).

Es könnte während der Lagerung auch zu einem Ansteigen der mitochondrialen Calciumkonzentration kommen, was die höheren Atmungsraten erklären könnte. Diese Hypothese wird durch eine Vielzahl von Befunden gestützt, nach denen die Mitochondrienfunktion durch ansteigendes Calcium aktiviert wird (Balaban 2002; Balaban et al. 2003). Danach sollen die Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase und  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase durch Calcium aktiviert werden können (McCormack und Denton 1993). Andererseits ist auch bekannt, dass ansteigendes mitochondriales Calcium die Mitochondrienfunktion hemmt (Wojtczak et al. 1999). So soll Calcium die  $F_0F_1$ -ATPase und auch die Aktivität vom Komplex I hemmen. Es könnte auch sein, dass sich während der Lagerung der mitochondriale Calcium-Gehalt vermindert.

Bei protrahierter Lagerung über 36 Stunden hinaus ergaben sich trotz gleicher Handhabung der Muskelproben individuelle Unterschiede. Während manche Muskelproben auch weiterhin stabile aktive Atmungswerte zeigten, fielen diese bei anderen unabhängig vom verwendeten Substrat deutlich ab. Möglicherweise verlaufen die zu Funktionsverlusten führenden Vorgänge individuell unterschiedlich schnell. Alter und Geschlecht der Patienten hatten keinen Einfluß auf die Stabilität der mitochondrialen Funktion. Auch kann die Einhaltung einer ununterbrochenen Kühlkette nicht vor diesen Funktionsverlusten schützen.

Über die zur Funktionsschädigung der Mitochondrien führenden Vorgänge lassen sich nur Vermutungen anstellen. Eventuell spielen die während der Lagerung entstehenden freien Sauerstoffradikale eine Rolle. Immerhin sind die Mitochondrien während der Lagerung einem sehr hohen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranen sind gegenüber einer Peroxidation besonders empfindlich. Bei reperfundierten Muskelfasern wurde ein Anstieg der freien Radikale parallel mit einer zunehmenden Rate an Lipidperoxidation beschrieben (Lucas et al. 1998). Bei der Peroxidation von Membranlipiden kommt es zur Fragmentierung ungesättigter Fettsäuren mit Freisetzung von Aldehyden und anderen zytotoxischen Produkten. Denkbar wäre auch eine Schädigung der Mitochondrienmembranen infolge der Schwellung der Mitochondrien. Bei Aufreißen der mitochondrialen Außenmembran geht die Barrierefunktion der Membran verloren, was zu einer Abnahme der dynamischen ADP-Kompartimentation führt (Gellerich et al. 1994). Darüber hinaus kann durch Freisetzung von Cytochrom c und dem Apoptose-induzierenden Faktor die Apoptose eingeleitet werden (Cai et al. 1998; Lemasters et al. 1998). Weiterhin ist die Aktivierung von Calpain, einer Calcium-abhängigen Protease, in Betracht zu ziehen. So konnte am ischämischen Herzen gezeigt werden, dass Calpain an der Störung der mitochondrialen Funktion beteiligt ist (Trumbeckaite et al. 2003). Untersuchungen an Lebermitochondrien zeigten, dass Calpain durch Öffnen der PTP als Auslöser der Apoptose fungieren kann (Gores et al. 1998). Calcium kann zur Aktivierung von Calpain führen (Suzuki et al. 1995). Bei Ischämie und Reperfusion ist eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration beschrieben (Piper et al. 1994; Reimer und Jennings 1992). Vielleicht spielt dieser Prozess auch bei der Lagerung von Muskelfasern eine Rolle. Möglicherweise spielen bei der lagerungsbedingten Beeinträchtigung der mito-

chondrialen Funktion auch Störungen bei der Interaktion zwischen Mitochondrien und Cytoskelet eine Rolle. So konnte von Milner et al. gezeigt werden, dass bei Ablation der Desmin-Expression in genetisch veränderten Mäusen die Maximalgeschwindigkeit der aktiven Atmung in den Desmin-Null-Fasern gegenüber der Kontrollgruppe deutlich vermindert ist (Milner et al. 2000).

Die zeitliche Stabilität der Atmungsraten während der State 3-Phase zeigte bei allen Experimenten ein ähnliches Verhalten. Während in den ersten Lagerungsstunden die Atmungsgeschwindigkeiten während der State 3-Phase über die 10-minütige Messung nur wenig abfielen, zeigten sie bei weiterer Lagerung eine deutliche Instabilität und fielen von einem relativ hohen Anfangswert sofort nach Zugabe von ADP auf einen deutlich niedrigeren Wert nach 10 Minuten ab. Diese Instabilität deutet auf einen Defekt beim Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten hin. Möglicherweise sind Enzyme der Atmungskette, des Zitratcyclus, die primären Dehydrogenasen oder Substrat-Translokatoren gestört. Nach über 36 Stunden Lagerung stabilisierte sich die State 3-Atmung aus ungeklärter Ursache allerdings wieder.

Während die Einhaltung oder Unterbrechung der Kühlkette keinen erkennbaren Einfluss auf die aktive Atmung zeigten, hatten die Temperaturschwankungen große Auswirkungen auf das Verhalten der Atraktolat-insensitiven Atmung. Bei vollständiger Einhaltung der Kühlkette stiegen die State 4-Werte bis zu 36 Stunden nur leicht an. Die Permeabilität der Innenmembran der Mitochondrien scheint unter diesen Bedingungen nicht wesentlich verändert zu sein. Nach protrahierter Lagerung über 36 Stunden hinaus stiegen die State 4-Werte deutlich an und signalisierten damit eine zunehmende Entkopplung der Mitochondrien.

Die RCI-Werte widerspiegeln das bereits Gesagte. Sie bleiben bei Einhaltung optimaler Lagerungsbedingungen bis zu 36 Stunden annähernd konstant und zeigten erst nach über 36 Stunden Lagerung deutliche Funktionsverluste an. Auch die Leak-Atmungsraten blieben bei Einhaltung optimalen Lagerungsbedingungen bis zu 36 Stunden stabil, was für eine weitestgehende Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran spricht.

Unter praktischen Gesichtspunkten ist insbesondere die Konservierung der mitochondrialen Funktion bis zu 24 Stunden von Bedeutung. Das Versenden von Muskelproben in spezialisierte Zentren, die umfassende Analyse einer einzelnen Probe, die Durchfüh-

rung von Kontrollmessungen, all dies wäre bei einer stabilen Mitochondrienfunktion über 24 Stunden möglich. Da es sich bei Pyruvat/Malat um die wichtigsten physiologischen Substrate der mitochondrialen Atmungskette handelt, die auch in der Routinediagnostik mitochondrialer Störungen eine zentrale Rolle spielen, wurde der Stabilität der Pyruvat-abhängigen Atmung besondere Beachtung geschenkt. In fünf Lagerungsexperimenten wurden nach 24 Stunden Lagerung State 3-Atmungsraten zwischen 123 % und 187 % der Ausgangswerte gemessen, wobei der Anstieg der Atmung in vier Fällen signifikant war. In der Annahme, dass die Messungen nach 24 Stunden durchgeführt werden und die wirklichen Ausgangswerte nicht bekannt sind, wäre hier ein Korrekturfaktor von 0,53 bis 0,81 zur Ermittlung der hypothetischen Ausgangswerte anzusetzen. Die starke Streuung der Werte macht deutlich, dass es anhand dieser Ergebnisse leider nicht möglich ist, einen allgemeingültigen Korrekturfaktor zur Ermittlung des hypothetischen Ausgangswertes aus der nach einer bestimmten Lagerungszeit ermittelten Atmungsrate anzugeben.

Ob das beobachtete Verhalten normaler Mitochondrien auch auf pathologisch veränderte Mitochondrien übertragbar ist, ist unklar. Dennoch sollte der zum Teil erhebliche Anstieg der Atmungsraten über die Lagerungszeit insbesondere bei deutlich protrahierten Untersuchungen nach Probenentnahme bedacht werden. Insbesondere im Rahmen diagnostischer Untersuchungen können sich aufgrund der nicht auszuschließenden Maskierung von pathologischen Befunden durch einen Anstieg der Atmungsraten über die Zeit Schwierigkeiten bei der Interpretation von normwertigen, besonders im unteren Grenzbereich der Norm liegenden, Befunden ergeben. Es ist daher empfehlenswert, diese nur in der Zusammenschau mit den klinischen Befunden und den Ergebnissen alternativer Untersuchungsmethoden, wie der Enzymanalytik, der Myohistologie sowie der Molekulargenetik, zu beurteilen, was ohnehin zur Diagnosesicherung unbedingt erforderlich ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Stabilität der mitochondrialen Funktion bei Lagerung der Muskelfasern bis zu 36 Stunden. Anhand der aktiven Atmung, die über diese Lagerungszeit leicht ansteigt, ließen sich keine Funktionsverluste erkennen. Die kontrollierte Atmung steigt während der Lagerungszeit ebenfalls leicht an, was auf eine zunehmende Permeabilität der mitochondrialen Innenmembran hindeutet. Eine

mitochondriale Funktionstörung mit Entkopplung der Oxidationsprozesse von der oxydativen Phosphorylierung ist nur bei der Luft'schen Erkrankung, die bisher lediglich bei zwei Patienten beschrieben wurde und mit einer sehr charakteristischen Klinik einhergeht, klinisch relevant (Ernster et al. 1959; Luft et al. 1962; Afifi et al. 1972). Daher sollte das leichte Ansteigen der State 4-Atmung während der Lagerung der Muskelfasern in der Diagnostik von mitochondrialen Funktionsstörungen eine untergeordnete Rolle spielen.

Diese Ergebnisse führen zu einer deutlichen Erweiterung der Anwendbarkeit der respiratorischen Methode. Zum einen lässt sich aufgrund der nunmehr relativierten zeitlichen Limitierung während der Untersuchung das Analysenspektrum einer einzelnen Probe deutlich erweitern. Zum anderen scheint ein Versenden von Muskelbiopsien in spezialisierte Zentren möglich.

Diese Ergebnisse werden durch ähnliche Messungen an Herz- und Skelettmuskel des Kaninchens bestätigt (Trumbeckaite et al. 2001). Es konnte klar gezeigt werden, dass die Mitochondrienfunktion auch in Herzfasern und Skelettmuskelfasern von Kaninchen bis zu 30 Stunden stabil bleibt. Die Konservierung der Mitochondrienfunktion ist allerdings nur bei optimalen Lagerungsbedingungen möglich. Diese Befunde waren die Grundlage für eine wissenschaftliche Zusammenarbeit zwischen dem Muskellabor Halle und der Inneren Klinik in Gießen. Die Tierversuche wurden in Gießen durchgeführt, während die Mitochondrienfunktion in Halle untersucht wurde. Zu diesem Zweck wurden Muskelfasern in 35 Sendungen über Nacht nach Halle verschickt. Auf diese Weise gelang der Nachweis, dass Endotoxin die Mitochondrienfunktion im Herz- und Skelettmuskel alteriert (Trumbeckaite et al. 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Calpain-Inhibitoren ischämiebedingte Schäden der Mitochondrienfunktion vermindern können. Es muß allerdings gesagt werden, dass die beobachtete Stabilität speziesabhängig ist und z.B. für Skelettmuskulatur der Maus nicht zutrifft (Gellerich et al., nicht publiziert).

Neben der hier diskutierten Kurzzeitkonservierung der mitochondrialen Funktion bis zu 36 Stunden werden derzeit auch Möglichkeiten der unbegrenzten Langzeitkonservierung von funktionell intakten Mitochondrien in flüssigem Stickstoff untersucht. Wäh-

rend es möglich ist, die Mitochondrienfunktion in intakten Zellen (Myoblasten, Spermien, Fibroblasten) beim Einfrieren zu erhalten, ist die Kältekonservierung von isolierten Muskelmitochondrien bisher nicht gelungen (Fuller et al. 1989; Loecker et al. 1991; Lemeshko et al. 1986). Inzwischen gibt es erste vielversprechende Ansätze für eine Kryokonservierung von Muskelmitochondrien in permeabilisierten Muskelfasern mit Dimethylsulfoxid in flüssigem Stickstoff (Kusnetzov et al. 2003).

Ein großes Problem stellen die erheblichen Schwankungen der State 3-Atmungswerte, zum Teil bis um den Faktor 2, dar. Hierfür wird zum einem die unterschiedliche Trocknung der einzelnen Proben vor dem Wägen verantwortlich gemacht. Die im Inkubationsmedium gewaschenen Fasern werden dazu zwischen Fließpapier gepresst. Durch starkes Trocknen der Probe steigt der relative Mitochondriengehalt und damit auch die auf das Probengewicht bezogenen Atmungsgeschwindigkeiten an. Man könnte dieses Problem umgehen, indem man die Fasern nach der oxygraphischen Messung standardisiert im Trockenschrank trocknet und dann die Atmungsraten auf das Trockengewicht bezieht. Aber auch diese Methode ist fehlerhaft, da es schwierig ist, die Fasern wieder vollständig aus der Messzelle zu extrahieren. Außerdem löst der Bezug auf Trockengewicht nicht das Problem der Mikroheterogenität der Fasern, die ebenfalls für die Streuung der Einzelwerte verantwortlich gemacht werden muß. Die Menge der in der individuellen Faser enthaltenen Mitochondrien ist von pathologischer Proliferation oder physischem Training abhängig und kann um den Faktor 6 variieren (Gellerich et al. 2002). Diese Problematik ließ sich bisher nur durch eine Vielzahl von Einzelmessungen lösen. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Normierung funktioneller und enzymatischer Messwerte auf ein Markerenzym für die Mitochondrienmenge. Hierfür eignet sich die Citratsynthase, deren Aktivität streng mit der Mitochondrienmenge korreliert (Schwerzmann et al. 1989). Enzymdefekte und sekundäre Änderungen sind für die Citratsynthase nicht beschrieben.

Ein weiterer Ansatz findet sich in der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration. Mit deren Hilfe wird es möglich, mit der Ermittlung der Succinat-bezogenen Pyruvatatmung einen vom Mitochondriengehalt der einzelnen Probe unabhängigen Funktionsparameter zu messen. Bei normaler menschlicher Skelettmuskulatur beträgt die SRPR 120 %. Bei Patienten mit Deletionen und Punktmutationen in der mitochondrialen DNA, bei Sep-

sis, Tumorbildung, Haloperidolintoxikation und Altern vermindert sich die SRPR signifikant (Gellerich et al. 2004). Die SRPR ist demnach geeignet, um akute und mutationsbedingte Komplex I-abhängige Veränderungen der Mitochondrienfunktion zu detektieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei einer Lagerung bis zu 36 Stunden die SRPR konstant bleibt. Demnach kommt es während dieser Lagerungszeit nicht zu Komplex I-abhängigen Funktionsänderungen.

Beim Vergleich der Pyruvat-abhängigen State 3-Atmungen mit den korrespondierenden Succinat-abhängigen Pyruvatatmungen wird erkennbar, dass die Schwankungsbreite der SRPR kleiner ist als die der State 3-Atmungen. Das weist darauf hin, dass ein Großteil der Schwankungen der aktiven Atmungsraten nicht auf Methodenungenauigkeiten oder Messfehlern beruht, sondern tatsächlich durch Mikroheterogenitäten bedingt ist. Nicht gelöst ist damit allerdings das Problem der inhomogenen Verteilung von geschädigten Mitochondrien über ein Organ und auch innerhalb einzelner Muskelfasern.

### **5.3 Optimierung und Weiterentwicklung der Skinned fiber-Technik**

Durch den Vergleich der unter unterschiedlichen Kühlbedingungen durchgeführten Experimente wurde es möglich, den Einfluss der Lagerungstemperatur auf die funktionelle Stabilität der Mitochondrien zu untersuchen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich die Unterbrechung der Kühlkette nachteilig auf die Mitochondrienfunktion auswirkt. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass es bei nicht optimaler Lagerung zu einem verstärkten Anstieg der Atraktylat-insensitiven Atmung kommt. Parallel dazu fallen die respiratorischen Kontrollkoeffizienten ab. Bei zwei Experimenten ließ sich ein deutlicher Anstieg der Leak-Atmung nachweisen. Als Ursache könnte eine im Verlauf der Lagerung erfolgende Aktivierung von Phospholipasen diskutiert werden, die über die Bildung von Lysophospholipiden Leaks in der mitochondrialen Innenmembran hervorrufen (Reimer und Jennings 1992). Wahrscheinlicher ist allerdings eine partielle Öffnung der PTP.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass zum Konservieren der Mitochondrienfunktion die strikte Einhaltung einer ununterbrochenen Kühlkette unumgänglich ist. Demnach setzt die bis zu 36 Stunden Lagerung nachgewiesene Stabilität der mitochondrialen Funktion optimale Lagerungsbedingungen voraus.

Um den Erhalt der Mitochondrienfunktion weiter zu verbessern, wurde nach geeigneten Zusätzen zum Storagepuffer gesucht. Kuznetsov et al. konnten zeigen, dass die in Trypsin, Chymotrypsin oder Elastase behandelten slow-twitch Skelettmuskelfasern im Vergleich zu fast-twitch Fasern hohe  $K_m$ -Konstante sinkt (Kuznetsov et al. 1996). Zurückgeführt wird dies auf ein Trypsin- und Chymotrypsin-sensitives zytoplasmatisches Protein, welches die Permeabilität der mitochondrialen Außenmembran für Adeninnukleotide kontrollieren soll. Aufgrund dieser Hinweise wurden Proteinase-Inhibitoren (Trypsin-Inhibitor, Benzamidine, Leupeptin und Pepstatin A) auf eine konservierende Wirkung geprüft.

Ein weiterer bekannter Störfaktor bei der respirometrischen Messung ist die Verunreinigung mit Mikroorganismen (Gnaiger et al. 1983). Insbesondere an freien Oberflächen und in den Medien ist mit einem erheblichen Bakterienwachstum zu rechnen. Daher wurde der Zusatz von Gentamicin als nicht mitochondrientoxisches Breitspektrumantibiotikum untersucht.

Bemerkenswerterweise waren bei Lagerung der Muskelfasern in dem durch Zusätze veränderten Puffer für alle Substrate deutlich höhere Atmungsraten zu verzeichnen. Die ebenfalls erhöhte Atraktylat-insensitive Atmung deutete aber auf eine entkoppelnde Wirkung der Zusätze hin. Darüber hinaus nahm der nichtmitochondriale Sauerstoffverbrauch zu. Demnach scheinen die Proteinaseinhibitoren und Antibiotika Schädigungen der Mitochondrien zu verursachen.

Bei den Überlegungen zur Optimierung der Messbedingungen stellte sich die Frage, inwieweit eine Lagerung von bereits permeabilisierten Muskelfasern ohne negative Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften möglich ist. Die Permeabilisierung des gesamten vorhandenen Muskelmaterials in einem Arbeitsschritt würde gegenüber der Aufbereitung in Einzelportionen eine beträchtliche Zeitersparnis ermöglichen. Nach Saks et al. (1998) ist eine solche Lagerung bei 0 °C im Storagepuffer bis zu 5 Stunden ohne Beeinträchtigung der Mitochondrien möglich (Saks et al. 1998). Die eigenen Untersuchungen an drei Muskelbiopsien ergaben keine einheitlichen Ergebnisse. Im Gegensatz zu den Daten von Saks blieb die mitochondriale Funktion nur bei einer Muskelprobe bis zu 10 Stunden stabil. Die beiden anderen Experimente zeigten völlig unterschiedliche Ergebnisse. Während bei einem Experiment eine deutliche Entkopplung



der mitochondrialen Atmung auftrat, stieg bei dem anderen Experiment die aktive Atmung im Laufe der Lagerung kontinuierlich an.

Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass die Lagerung bereits permeabilisierter Muskelfasern vermieden werden sollte.

#### **5.4 Untersuchung von zugesandten Biopsien**

In dieser Arbeit konnte erstmals experimentell gezeigt werden, dass die Mitochondrienfunktion bis zu 36 Stunden erhalten werden kann. Damit war die Grundlage gegeben, Biopsieproben aus anderen Kliniken in das Muskellabor Halle schicken zu lassen.

Im Zeitraum von 1996 bis 2002 erreichten 41 per Kurierdienst zugesandte Biopsien das Muskellabor. Bei dem Versand über Nacht musste von einer 12- bis 24-stündigen Lagerungszeit ausgegangen werden. Bei den Patienten bestand aufgrund des klinischen Bildes der Verdacht auf mitochondriale Enzephalomyopathien.

Die Biopsien wurden funktionell mittels respirometrischen Messungen sowie enzymatisch und teilweise auch histologisch untersucht.

Bei 31 der eingesandten Proben waren keine Auffälligkeiten feststellbar, es konnte eine normale Mitochondrienfunktion nachgewiesen werden. Die Atmungsraten und die Enzymaktivitäten zeigten mit Ausnahme der Atraktolat-insensitiven Atmung und der Citratsynthase-Aktivität keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollwerten. Die gegenüber den Kontrollwerten signifikant erhöhte State 4-Atmung steht im Einklang mit den bei Lagerung von Muskelmaterial von orthopädischen Patienten gefundenen Ergebnissen, bei denen insbesondere bei nicht optimaler Kühlung entkoppelnde Prozesse zum Tragen kommen. Möglicherweise spielt dies auch bei den zugesandten Biopsien eine Rolle. Die auffällig erhöhte Citratsynthase-Aktivität gegenüber den Kontrollwerten könnte am überproportionalen Anteil von Muskeln mit einem höherem Mitochondriengehalt liegen. So ist der M. tibialis anterior und der M. gastrocnemius im Biopsiegut von zugeschickten Proben deutlich häufiger vertreten als bei den Kontrollbiopsien, bei denen es sich meist um den M. vastus lateralis oder medialis handelte.

Bei 10 Proben wurden jedoch von den Kontrollwerten abweichende Befunde gefunden. Zwei dieser Proben bestanden nur zum sehr geringen Teil aus Muskelmaterial. Im wesentlichen handelte es sich um Fett- und Bindegewebe, weshalb keine normalen Ergebnisse erhalten werden konnten.

Bei fünf Proben konnten die Veränderungen auf Missmanagement bei Probenentnahme oder Transport zurückgeführt werden. Zwei Proben erreichten das Labor im gefrorenen Zustand. Bei diesen Proben war die Pyruvatatmung deutlich vermindert, während die Succinatatmung fast normal war. Die Komplex I-abhängige Atmung ist scheinbar stör anfälliger. Andere Proben wurden zu lange bei Raumtemperatur gelagert, was ebenfalls vornehmlich zur Verminderung der Komplex I-abhängigen Atmung führte. Eine Probe kam erst nach zwei Tagen im aufgetauten Zustand ins Labor. Auch hier zeigte sich insbesondere eine verminderte Komplex I-abhängige Atmung. Diese Biopsien verdeutlichen eindrücklich die Notwendigkeit der sorgfältigen Durchführung der Biopsie und der Einhaltung der Lagerungs- und Transportvorschriften. Nachdem die Absender der Proben geschult worden waren, traten solche Probleme nicht mehr auf und die Proben kamen in ausgezeichnetem Zustand in Halle an.

Die auf der Grundlage dieser Arbeit entwickelte Anleitung zum Versenden von Muskelmaterial umfasst folgende Punkte:

1. Ablage der entnommenen Muskelprobe in einer eisgekühlten, mit Storagepuffer befeuchteten Petrischale
2. Entfernung von Fett- und Bindegewebe mittels Pinzetten
3. Zerfaserung des Muskelstückes in grobe Muskelbündel mittels Pinzetten
4. Überführung der Muskelbündel in ein mit ausreichend eisgekühltem Storagepuffer gefüllten Eppendorfröhrchen
5. Lagerung des verschlossenen Eppendorfröhrchens in einer Eis-Wasser-Mischung bei 4 °C in einem isolierenden Behälter (z.B. Styroporbehälter).

Ein längeres Trockenliegen der Muskelfasern sowie das Gefrieren oder Erwärmen der Probe sind unbedingt zu vermeiden. Erstrebenswert ist eine maximale Zeit von 24 Stunden zwischen Entnahme und Ankunft im Labor.

Bei drei der respirometrisch auffälligen Biopsien ließen sich keine Entnahmefehler oder Transportschäden feststellen, so dass sowohl mitochondriale Störungen oder aber auch eine zeitliche Instabilität der mitochondrialen Funktion dieser Muskelfasern in Erwägung gezogen werden mussten.

Bei einer dieser Proben fand sich ein eindeutig pathologischer histologischer Befund, der myopathische Veränderungen zeigte. Aufgrund der normalen enzymatischen Befunde ist davon auszugehen, dass ein möglicher Enzymdefekt außerhalb der untersuchten Enzyme liegt. In einer weiteren Biopsie ließen sich eine COX-Defizienz sowie unspezifische histologische Veränderungen nachweisen, die mit einer Critical-Illness-Myopathie vereinbar wären. Bei beiden lag damit der Verdacht auf eine primäre mitochondriale Störung nahe. Bei der dritten respirometrisch auffälligen Biopsie war bei unauffälligen Enzymaktivitäten die histologische Untersuchung wegen starker Artefakte nicht auszuwerten. Die Ursache für die pathologischen respirometrischen Befunde konnte daher nicht geklärt werden. In diesem Fall ist eine Instabilität der mitochondrialen Funktion nicht sicher auszuschließen. Da jedoch das für die Histologie eingesandte Muskelstück ebenfalls nicht optimal aufgearbeitet wurde, steht zu vermuten, dass wahrscheinlich doch ein Missmanagement vorlag.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass ein Versand der Muskelproben per Kurierdienst über Nacht zur anschließenden oxygraphischen Messung in einem spezialisierten Labor bei Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion möglich scheint, wodurch die Anwendbarkeit der respirometrischen Methode bei der funktionellen Diagnostik deutlich erweitert wird. Angemerkt werden soll allerdings, dass sich anhand dieser Daten keine definitive Aussage über die funktionelle Stabilität von partiell defekten Mitochondrien treffen lässt. Eine progrediente Funktionsverschlechterung über die Lagerungszeit ist nicht auszuschließen, so dass eventuell auch subklinische Veränderungen nach der Lagerung zum Tragen kommen. Zum anderen ist eine Maskierung von Defekten aufgrund möglicherweise ansteigender Atmungswerte während der Lagerung, was bei gesunden Mitochondrien regelmäßig beobachtet wurde, denkbar und sollte bei zugesandten Biopsien beachtet werden.

## 6 Zusammenfassung

Zur funktionellen Untersuchung von Mitochondrien bei der Diagnostik mitochondrialer Enzephalomyopathien findet die Skinned fiber-Technik in Verbindung mit der hochauflösenden Respirometrie zunehmend Anwendung. Die Weiterentwicklung und Optimierung dieser Methode standen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Einen Schwerpunkt bildete dabei die Untersuchung der Langzeitstabilität der Mitochondrienfunktion in Skelettmuskelfasern. In 13 Lagerungsexperimenten mit Muskelproben von Patienten ohne mitochondriale Erkrankungen wurde gezeigt, dass die Mitochondrienfunktion bei der Veratmung von Komplex I- und II-abhängigen Substraten bis zu einer Lagerungszeit von 36 Stunden stabil blieb. Bei darüber hinausgehender Lagerung verschlechterte sie sich jedoch deutlich. Bis zu einer Lagerungszeit von 24 bis 36 Stunden stiegen die aktiven Atmungsraten in den meisten Fällen leicht an, um danach wieder abzufallen, ohne das Ausgangsniveau zu unterschreiten. Die Ursachen für den vorübergehenden Aktivitätsanstieg könnten in veränderten mitochondrialen Calciumkonzentrationen und in einer verbesserten Zugänglichkeit der Mitochondrien liegen. Die Atraktylat-gehemmten Atmungsraten nahmen bis zu 36 Stunden Lagerungszeit ebenfalls leicht zu. Durch Optimierung der Lagerungsbedingungen (ununterbrochene Kühlkette) ließ sich der Anstieg der Atraktylat-gehemmten Atmung vermindern, was auf eine verbesserte Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran hinweist. Bei Nichteinhaltung eines optimalen Kühlregimes kam es zu funktionellen Verschlechterungen, was sich in einem mit der Lagerungszeit deutlich abfallenden RCI ausdrückte.

Die relativ hohen Schwankungsbreiten der aktiven Atmungsraten bei Parallelmessungen werden vermutlich durch unterschiedliche Mitochondriengehalte in den Fasern verursacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SRPR als ein von der Mitochondrienmenge unabhängiger Parameter neu etabliert. Es wurde ein neues Messprotokoll entwickelt, bei dem die Komplex I-abhängige Atmung mit den Substraten Pyruvat/Malat und nach Hemmung des Komplexes I mit Rotenon die Komplex II-abhängige Atmung mit Succinat gemessen wird. Bei Anwendung dieser Technik auf die Lagerungsproblematik konnte klar gezeigt werden, dass die Komplex I-abhängige Mitochondrienfunktion bis zu einer Lagerungszeit von 36 Stunden voll erhalten bleibt.

Durch den Zusatz von Proteinase-Inhibitoren und einem Antibiotikum zum Storagepuffer ließ sich keine bessere Konservierung der Mitochondrienfunktion erreichen. Bei einer Lagerung des Muskelmaterials im bereits permeabilisierten Zustand war die zeitliche Stabilität der Mitochondrien nicht immer gegeben, weshalb das Biospiematerial erst unmittelbar vor der respirometrischen Untersuchung permeabilisiert werden sollte. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sollte es möglich sein, Muskelproben per Kurierdienst zu diagnostischen Zwecken in spezialisierte Labors zu versenden. Wir untersuchten zugesandtes Muskelmaterial von 41 Patienten mit Verdacht auf eine mitochondriale Erkrankung. Bei sieben zugesandten Biopsien mussten Entnahme- oder Versandfehler festgestellt werden. Die mitochondriale Funktion war deutlich gestört. Anhand dieser Proben wurde ersichtlich, dass insbesondere ein sofortiges Überführen in eisgekühlten Storagepuffer, der eisgekühlte Versand im Styroporbehälter ohne Auftauen oder Gefrieren der Probe sowie die Einhaltung einer maximalen Transportzeit von etwa 24 Stunden unerlässlich sind, um zuverlässige Messungen durchführen zu können. 34 der empfangenen Proben waren im ordnungsgemäßen Zustand. Von diesen konnten bei 31 Proben unauffällige respirometrische sowie enzymatische Befunde erhoben werden. Eine Schädigung der Muskelfasern durch Lagerung oder Transport war nicht erkennbar. Bei drei Biopsien wurde in der respirometrischen Untersuchung ein Komplex I-abhängiges Funktionsdefizit nachgewiesen. Bei zwei dieser Proben konnten die pathologischen respirometrischen Befunde durch eindeutig pathologische enzymatische respektive histologische Befunde gestützt werden, so dass der Verdacht auf eine primäre mitochondriale Störung nahe lag. In einem Fall konnte die für die histologische Untersuchung bestimmte Probe wegen unsachgemäßer Asservierung nicht beurteilt werden, während die Enzymaktivitäten unauffällig waren. Hier musste die Ursache für die mitochondriale Funktionsstörung offen bleiben. Insgesamt ließ sich zeigen, dass bei einem Versand der Muskelproben unter Einhaltung der erforderlichen Transportbedingungen die mitochondriale Funktion unbeeinflusst bleibt, so dass eine anschließende respirometrische Untersuchung in einem spezialisierten Labor möglich ist. Die Anwendbarkeit und der Stellenwert der oxygraphischen Methode bei der Diagnostik von mitochondrialen Enzephalomyopathien wird dadurch deutlich erweitert.

## 7 Literaturverzeichnis

Afifi AK, Ibrahim MZ, Bergman RA, Haydar NA, Mire J, Bahuth N, Kaylani F: Morphologic features of hypermetabolic mitochondrial disease. A light microscopic, histochemical and electron microscopic study. *J Neurol Sci.* 1972 Mar;15(3):271-90.

Alston TA, Mela L, Bright HJ: 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Sep;74(9):3767-71.

Balaban RS: Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Oct;34(10):1259-71.

Balaban RS, Bose S, French SA, Territo PR: Role of calcium in metabolic signaling between cardiac sarcoplasmic reticulum and mitochondria in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003. Feb;284(2):C285-93.

Bank W, Chance B: An oxidative defect in metabolic myopathies: diagnosis by noninvasive tissue oximetry. *An Neurol* 1994 Dec;36(6):830-7.

Beal MF: Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 2000 Jul;23(7):298-304.

Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR: Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 1994 Oct;26(5):509-17.

Bernsen PL, Gabreels FJ, Ruitenbeek W, Sengers RC, Stadhouders AM, Renier WO: Successful treatment of pure myopathy, associated with complex I deficiency, with riboflavin and carnitine. *Arch Neurol* 1991 Mar;48(3):334-8.

Bet L, Bresolin N, Moggio M, Meola G, Prella A, Schapira AH, Binzoni T, Chomyn A, Fortunato F, Cerretelli P et al.: A case of mitochondrial myopathy, lactic acidosis and complex I deficiency. *J Neurol* 1990 Nov;237(7):399-404.

Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG: Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol.* 1999 Nov;46(5): 787-90.

Bossy-Wetzel E und Green DR: Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem.* 1999 Jun 18;274(25):17484-90.

Brierley EJ, Johnson MA, James OF, Turnbull DM: Effects of physical activity and age on mitochondrial function. *QJM* 1996 Apr;89(4):251-8.

Cai J, Yang J, Jones DP: Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 10;1366(1-2):139-49.

Chinnery PF, Turnbull DM: Mitochondrial medicine. *QJM.* 1997 Nov; 90(11): 657-67.

Cooper J M, Clark J B: The structural organization of the mitochondrial respiratory chain. In: Schapira, A. H. V., S. DiMauro (eds.): *Mitochondrial Disorders in Neurology*. Butterworth-Heinemann, Boston u. London (1994) 1-30.

Di Mauro S, Di Mauro PMM: Muscle carnitin palmytoyltransferase deficancy and myoglobinuria. *Science* 182 (1973) 929-935.

Engel AG, Angelini C: Carntin deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy. A new syndrom. *Science* 179(1973) 899-904.

Engel WK, Cunningham GG: Rapid examination of muscle tissue: an improved trichome stain method of resh-frozen biopsy sections. *Neurology (Minneap.)* 13, 1963; 919-923.

Ernster L, Ikkos D, Luft R: Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* 184 (1959); 18512-1854.

Finsterer J: Mitochondriopathien. *Akt. Neurologie* (1997), 24: 231-241.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Stadhouders AM, Trijbels JM, Sengers RC, Janssen AJ, Veerkamp JH: Investigation of mitochondrial metabolism in small human skeletal muscle biopsy specimens. Improvement of preparation procedure. *Clin Chim Acta* 1985 Jan 15;145(1):89-99.

Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM: Molecular ordering of apoptosis induced by anti-cancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1998 Oct 1;58(19):4453-60.

Gellerich FN, Bohnensack R, Kunz W: Control of mitochondrial respiration. The contribution of the adenine nucleotide translocator depends on the ATP- and ADP-consuming enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1983 Feb 17;722(2):381-91.

Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Müller T, Neudecker S, Zierz S: Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without treshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Biochim Biophys Acta* 2002 Oct 3;1556(1):41-52.

Gellerich FN, Kapischke M, Kunz W, Neumann W, Kuznetsov A, Brdiczka D, Nicolay K: The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. *Mol Cell Biochem* 1994 Apr-May;133-134:85-104.

Gellerich FN, B Kunz WS, Bohnensack R: Estimation of flux control coefficients from inhibitor titrations by non-linear regression. *FEBS Lett* 1990 Nov 12;274 (1-2):167-70.

Gellerich FN, Laterveer FD, Zierz S, Nicolay K: The quantitation of ADP diffusion gradients across the outer membrane of heart mitochondria in the presence of macromolecules. *Biochim Biophys Acta* 2002 Apr 22;1554(1-2):48-56.

Gellerich FN, Trumbeckaite S, Chen Y, Deschauer M, Mueller T, Zierz S: Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Eur Cytokine Netw* 2002 Oct-Dec;13(4):387-4.

Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, Zierz S, Muller-Werdan U, Werdan K, Redl H, Schlag G: Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. *Shock* 1999 May;11(5):336-41.

Gellerich FN, Trumbeckaite S, Mueller T, Deschauer M, Chen Y, Gizatullina Z, Zierz S: Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Biochem.* 2004 Jan-Feb; 256-257(1-2): 391-405.

Gonzalez-Crespo MR, Arenas J, Gomez-Reino JJ, Campos Y, Borstein B, Martin MA, Cabello A, Garcia-Rayo R, Ricoy JR: Muscle dysfunction in elderly individuals with hip fracture. *J Rheumatol* 1999 Oct;26(10):2229-32.

Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI, Bronk SF: Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 10;1366(1-2):167-75.

Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000 Feb;28(2):170-7.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 10;1366(1-2):79-94.

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988 Feb 25;331(6158):717-9.

Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap AP: Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J* 1997 Jun 1;324 ( Pt 2):447-53.

Jennings RB, Ganote CE: Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury. *Circ Res* 1976 May;38(5 Suppl 1):I80-91.

Jennings RB, Herdson PB, Sommers HM: Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. *Lab Invest* 1969 Jun;20(6):548-57.

Jerusalem F und Zierz S: Muskelerkrankungen. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1991. 2. neubearbeitete und erweiterte Auflage.

Joshi MS, Crouser ED, Julian MW, Schanbacher BL, Bauer JA: Digital imaging analysis for the study of endotoxin-induced mitochondrial ultrastructure injury. *Anal Cell Pathol* 2000;21(1):41-8.

Kay L, Daneshrad Z, Saks VA, Rossi A: Alteration in the control of mitochondrial respiration by outer mitochondrial membrane and creatine during heart preservation. *Cardiovasc Res* 1997 Jun;34(3):547-56.

Kirches EJ, Winkler K, Warich-Kirches M, Szibor R, Wien F, Kunz WS, von Bossanyi P, Bajaj PK, Dietzmann K: mtDNA depletion and impairment of mitochondrial function in a case of a multisystem disorder including severe myopathy. *J Inherit Metab Dis.* 1998 Jun;21(4):400-8.



Kudoh A, Kudoh E, Ishihara H, Matsuki A: ONO-5046, an elastase inhibitor, attenuates liver mitochondrial dysfunction after endotoxin. *Crit Care Med* 1998 Jan;26(1):138-41.

Kunz WS, Kuznetsov AV, Gellerich FN: Mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers is stimulated by caffeine. *FEBS Lett* 1993 May 24;323(1-2):188-90.

Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, Eichhorn K, Schild L, Striggow F, Bohnensack R, Neuhof S, Grasshoff H, Neumann HW, Gellerich FN: Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim Biophys Acta* 1993 Aug 16;1144(1):46-53.

Kuznetsov AV, Kunz WS, Saks V, Usson Y, Mazat JP, Letellier T, Gellerich FN, Margreiter R: Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. *Anal Biochem*. 2003 Aug 15;319(2):296-303.

Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Kay L, Daneshrad Z, Rossi A, Kadaja L, Peet N, Seppet E, Saks VA: Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem* 1996 Nov 1;241(3):909-15.

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B: The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 10;1366(1-2):177-96.

Lesnefsky EJ, Hoppel CL: Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Dec 15;420(2):287-97.

Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP: Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr Res* 1992 Jul;32(1):17-22.

Letellier T, Malgat M, Mazat JP: Control of oxidative phosphorylation in rat muscle mitochondria: implications for mitochondrial myopathies. *Biochim Biophys Acta* 1993 Feb 8;1141(1):58-64.

Löffler G and Petrides PE: *Biochemie und Pythobiochemie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Mailand, Paris Singapur, Tokio 1998.

Lucas DT, Szweda LI: Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jan 20;95(2):510-4.

Luft R, Ikkos, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B: A case of severe hypermetabolism of nonthyrotoxic origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control; a correlated clinical, biochemical and morphological study, *J Clinical Investigation* 41 (1962) 1776-1804.

Mazat JP, Letellier T, Bedes F, Malgat M, Korzeniewski B, Jouaville LS, Morkuniene R: Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies. *Mol Cell Biochem*. 1997 Sep;174(1-2):143-8.

- Mazat JP, Letellier T, Malgat M: The molecular basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases. In : Mazat JP (ed) Proceedings of the 5<sup>th</sup> BTK-Workshop. Plenum Press, London, 1993.
- McCormack JG, Denton RM: Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and the role of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism. *Dev Neurosci*. 1993;15(3-5):165-73.
- Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y: Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* 2000 Sep 18;150(6):1283-98.
- Moers A: Diagnostik mitochondrialer Myopathien und Enzephalomyopathien, in Siemens H Mitochondriale Myopathien und Enzephalomyopathien 75-81 W. Zuckerschwerdt-Verlag, 1990.
- Olson W, Engel WK, Walsh GO, Einaugler R: Oculocraniosomatic neuromuscular disease with "ragged-red" fibers. *Arch Neurol* 1972 Mar;26(3):193-211.
- Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL: Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Arch Biochem Biophys*. 1985 Feb 1;236(2):691-702.
- Pastorino JG, Simbula G, Gilfor E, Hoek JB, Farber JL: Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. *J Biol Chem* 1994 Dec 9;269(49):31041-6.
- Petit PX, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B, Kroemer G, Castedo M: Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem* 1997 Sep;174(1-2):185-8.
- Pfanner N, Rassow J, Wienhues U, Hergersberg C, Sollner T, Becker K, Neupert W: Contact sites between inner and outer membranes: structure and role in protein translocation into the mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990 Jul 25;1018(2-3):239-42.
- Piper HM, Noll T, Siegmund B: Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovasc Res* 1994 Jan;28(1):1-15.
- Rapoport SM: Medizinische Biochemie. 8. völlig neu überarbeitete Aufl., Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1983).
- Rasmussen HN, Andersen AJ, Rasmussen UF: Optimization of preparation of mitochondria from 25-100 mg skeletal muscle. *Anal Biochem* 1997 Oct 1;252(1):153-9.
- Rasmussen HN, Rasmussen UF: Small scale preparation of skeletal muscle mitochondria, criteria of integrity, and assays with reference to tissue function. *Mol Cell Biochem* 1997 Sep;174(1-2):55-60.
- Reichmann H, DiMauro S: Mitochondriale Medizin. *Akt. Neurologie* 25 (1998) 351-360.
- Reimer KA and Jennings RB: Myocardial Ischemia, Hypoxia, and Infarction. In: Fozzard HA et al. (Hrsg): The heart and cardiovascular system, 2. Aufl.; New York Raven Press, Ltd.; (1992) 1875-1973.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A: Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994 Jul;228(1):35-51.

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 Jul;184(1-2):81-100.

Schagger H: Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 2001;65:231-44.

Schapira AH: Mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* 1999 Feb 9;1410(2):99-102.

Schapira AH: Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* 1999 Feb 9;1410(2):159-70.

Scholte HR, Yu Y, Ross JD, Oosterkamp II, Boonman AM, Busch HF: Rapid isolation of muscle and heart mitochondria, the lability of oxidative phosphorylation and attempts to stabilize the process in vitro by taurine, carnitine and other compounds. *Mol Cell Biochem* 1997 Sep;174(1-2):61-6.

Schulze K, Becker BF, Schultheiss HP: Antibodies to the ADP/ATP carrier, an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo. *Circ Res* 1989 Feb;64(2):179-92.

Schwerzmann K, Hoppeler H, Kayar SR, Weibel ER: Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Mar;86(5):1583-7.

Shapira Y, Harel S, Russel A: Mitochondrial encephalomyopathies. A group of neuromuscular disorders with defects of defects of oxidativ metabolism. *Israel Israel J Med Sci* 13(1977).

Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C: The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13207-12.

Skladal D; Sperl W, Schranzhofer R, Krismer M, Gnaiger E, Margreiter R, Gellerich FN: Preservation of mitochondrial functions in human skeletal muscle during storage in high energy preservation solution (HEPS). In: Gnaiger E (Hrgs.): What is controlling life? Modern Trends in BiothermoKinetics 3, University Press Innsbruck; (1994), 268-271.

Sperl W, Skladal D, Gnaiger E, Wyss M, Mayr U, Hager J, Gellerich FN: High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Mol Cell Biochem* 1997 Sep;174(1-2):71-8.

Spiro AJ, Moore CL, Prineas JW, Strasberg PM, Rapin I: A cytochrom related inherited disorder of the nervous system and muscle. *Arch Neurol* 23 (1970) 103-112.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999 Jan 18;189(2):381-94.

Susin SA, Zamzami N, Kroemer G: Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 10;1366(1-2):151-65.

Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S: Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995 Sep;376(9):523-9.

Toleikis A, Majiene D, Trumbeckaite S, Dagys A, Jasaitis A: The effect of collagenase and temperature on mitochondrial respiratory parameters in saponin-skinned cardiac fibers. *Biosci Rep* 1996 Dec;16(6):513-9.

Tonkonogi M, Harris B, Sahlin K: Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *J Physiol* 1998 Jul 1;510 ( Pt 1):279-86.

Trijbels F, Huizing M, Ruitenbeek W, Sengers R, Smeitink J, DePinto V, Wendel U: Disturbances in mitochondrial transport systems leading to encephalomyopathies. *Biofactors* 1998;7(3):225-7.

Trijbels JM, Sengers RC, Ruitenbeek W, Fischer JC, Bakkeren JA, Janssen AJ: Disorders of the mitochondrial respiratory chain: clinical manifestations and diagnostic approach. *Eur J Pediatr* 1988 Nov;148(2):92-7.

Trumbeckaite S, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN: Calpain inhibitor (BSF 409425) diminishes ischemia/reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2003 Mar 1;65(5):911-6.

Trumbeckaite S, Opalka JR, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN: Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. *Eur J Biochem* 2001 Mar; 268(5):1422-9.

Van Biervliet JP, Bruinvis L, Ketting D, De Bree PK, Van der Heiden C, Wadman SK: Hereditary mitochondrial myopathy with lactic acidemia, a De Toni-Fanconi-Debre syndrome, and a defective respiratory chain in voluntary striated muscles. *Pediatr Res* 1977 Oct;11(10 Pt 2):1088-93.

Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA: Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 1987 Jun 29;892(2):191-6.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988 Dec 9;242(4884):1427-30.

Warburg O, Geissler AW, Lorenz S: Genesis of tumor metabolism by vitamin B1 deficiency (thiamine deficiency). *Z Naturforsch B.* 1970 Mar;25(3):332-3.

Willems JL, Monnens LAH, Triebels JMF: Leigh's encephalomyelopathy in a patient with cytochrome c oxidase deficiency in muscle tissue. *Pediatrics* 690(1977) 850-857.

Wisniewski E, Kunz WS, Gellerich FN: Phosphate affects the distribution of flux control among the enzymes of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria. *J Biol Chem* 1993 May 5;268(13):9343-6.

Wojtczak L, Teplova VV, Bogucka K, Czyz A, Makowska A, Wieckowski MR, Duszynski J, Evtodienko YV: Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial energetics. Further arguments for the role of Ca(2+) in the mechanism of the crabtree effect. *Eur J Biochem.* 1999 Jul;263(2):495-501.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997 Dec 1;139(5):1281-92.

Wrogemann K, Nylen EG, Adamson I, Pande SV: Functional studies on in situ-like mitochondria isolated in the presence of polyvinyl pyrrolidone. *Biochim Biophys Acta* 1985 Jan 23;806(1):1-8.

Yang JC, Cortopassi GA: Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free Radic Biol Med* 1998 Mar 1;24(4):624-31.

Zalman LS, Nikaido H, Kagawa Y: Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *J Biol Chem* 1980 Mar 10;255(5):1771-4.

Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G: Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* 1997 Apr;29(2):185-93.

Zierz S, Jerusalem F: Mitochondrial myopathies and encephalomyelopathies. *Nervenarzt* 1989 Jul;60(7):394-400.

Zierz S, Meessen S, Jerusalem F: Lactate and pyruvate blood levels in the diagnosis of mitochondrial myopathies. *Nervenarzt* 1989 Sep;60(9):545-8.

Zierz S, von Wesebe O, Bleistein J, Jerusalem F: Exogenous coenzyme Q (coq) fails to increase coq in skeletal muscle of two patients with mitochondrial myopathies. *J Neurol Sci* 1990 Mar;95(3):283-90.

Zierz S, von Wesebe O, Gerbitz KD, Jerusalem F: Ophthalmoplegia-plus: clinical variability, biochemical defects of the mitochondria respiratory chain and deletions of the mitochondria genome. *Nervenarzt* 1990 Jun;61(6):332-9.

Zoratti M, Szabo I: The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995 Jul 17;1241(2):139-76.

## 8 Thesen

- (1.) Seit Entdeckung der Luft'schen Erkrankung sowie von Mutationen in der mitochondrialen DNA als Ursache mitochondrialer Enzephalomyopathien konnten defekte Mitochondrien oder sekundäre mitochondriale Störungen als Ursache unzähliger Erkrankungen ermittelt werden. Die funktionelle Untersuchung von Mitochondrien in Muskelbiopsien gewinnt daher zunehmend an Bedeutung.
- (2.) Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Isolation von Mitochondrien aus Muskelfasern verzichtet man bei der Skinned fiber-Technik auf die Herauslösung der Mitochondrien aus dem Gewebe und untersucht sie in mit Saponin permeabilisierten Muskelfasern mittels hochauflösender Respirometrie.
- (3.) Als entscheidender Nachteil funktioneller Untersuchungen gilt die begrenzte Stabilität der Mitochondrien. Es bestand die Aufgabe, die Langzeitstabilität der Mitochondrienfunktion in Skelettmuskelfasern zu charakterisieren und gegebenenfalls zu verbessern mit dem Ziel, native Biopsieproben für diagnostische Zwecke verschicken zu können.
- (4.) Skelettmuskelfasern können in eisgekühltem Storagepuffer bis zu 36 Stunden gelagert werden, ohne dass die Mitochondrienfunktion bei der Veratmung von Komplex I- und II-abhängigen Substraten beeinträchtigt wird.
- (5.) Bis zu einer Lagerungszeit von 24 bis 36 Stunden stiegen die aktiven Atmungsraten in den meisten Fällen leicht an, um danach wieder abzufallen, ohne das Ausgangsniveau zu unterschreiten. Die Ursachen für den vorübergehenden Aktivitätsanstieg könnten in veränderten mitochondrialen Calciumkonzentrationen und in einer verbesserten Zugänglichkeit der Mitochondrien liegen.
- (6.) Lagerung über 36 Stunden hinaus führt zu verschlechterter Mitochondrienfunktion und sollte deshalb vermieden werden.
- (7.) Proben, bei denen die Kühlbedingungen nicht optimal eingehalten wurden, hatten schlechtere funktionelle Eigenschaften als optimal gelagerte Proben.

- (8.) Biopsieproben sollten nicht im permeabilisierten Zustand gelagert, sondern erst unmittelbar vor der Messung mit Saponin behandelt werden.
- (9.) Der Zusatz von Proteinase-Inhibitoren und einem Antibiotikum zum Storage-puffer erbrachte keine Verbesserung der Konservierung der Mitochondrienfunktion.
- (10.) Die multiple Substrat-Inhibitor-Titration bietet mit der Ermittlung der auf die Succinatatmung bezogenen Pyruvatatmung innerhalb einer Faser die Möglichkeit, einen vom Mitochondriengehalt der Muskelfasern unabhängigen Funktionsparameter zu gewinnen, der es erlaubt, Komplex I-abhängige Funktionsdefizite zu detektieren. Mit dieser Methode wurde gezeigt, dass die Komplex I-abhängige Mitochondrienfunktion während der Lagerung bis zu 36 Stunden konstant bleibt.
- (11.) Es konnte gezeigt werden, dass ein Versand von Biopsieproben möglich ist. Bei Gewährleistung der essentiellen Transportbedingungen, die insbesondere eine unverzügliche Storagepufferlagerung sowie die ununterbrochene Kühlung des Muskelmaterials in einer Eis-Wasser-Mischung beinhalten, können auch nach einer Transportzeit von 24 Stunden aussagekräftige respirometrische Messungen durchgeführt werden.
- (12.) Bei 31 der zugesandten Biopsien wurden normale respirometrische Befunde erhoben. Bei sieben Proben konnten die auffälligen Befunde auf Entnahmefehler oder Missmanagement zurückgeführt werden. Bei drei Biopsien wurde ein Komplex I-abhängiges Funktionsdefizit nachgewiesen, das in zwei Fällen enzymatisch und histologisch validiert werden konnte. Lediglich in einem Fall musste die Ursache für die mitochondriale Funktionsstörung offen bleiben.
- (13.) Die Anwendbarkeit der respirometrischen Methode bei der Diagnostik mitochondrialer Enzephalomyopathien wird durch die nachgewiesene Stabilität der Mitochondrienfunktion in Skelettmuskelfasern deutlich erweitert. Ein Probenversand in spezialisierte Zentren wird damit möglich. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, das bisher durch die zeitliche Limitierung begrenzte Analysenspektrum bei der Untersuchung einzelner Proben auszubauen und Kontrollmessungen durchzuführen.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Andrea K r a f t  
Geburtsdatum: 18.09.1973  
Geburtsort: Leipzig  
Eltern: Dr. Helmhard Kraft und Dr. Karin Kraft, geb. Herold  
Familienstand: ledig

### **Ausbildung**

1980-1984 Polytechnische Oberschule in Altenburg  
1984-1990 Polytechnische Oberschule in Halle  
1990-1992 Erweiterte Oberschule in Halle, Abitur  
1992-1999 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
14.05.1999 Ärztliche Prüfung

### **Beruf**

1999-2001 Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Neurologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. S. Zierz)  
07.12.2001 Approbation als Ärztin  
seit 2001 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Neurologie,  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. S. Zierz)

Halle, den 06.04.2004                      Andrea Kraft



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## **Erklärung über Promotionsversuche**

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle, den 06.04.2004

Andrea Kraft

## **Publikationen**

Teile der vorgelegten Arbeit wurden bereits in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Kraft A, v. 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 function in human skeletal muscle fibers during cold storage. 1st Colloquium on mitochondria and myopathies in Halle/Saale. J Mol Med (1995) 73: B45.

Gellerich FN, v. Wersebe O, Kraft A, Hein W, Haunschild M, Skladal D, Sperl W, Mueller LC, Gnaiger E, Margreiter M and Zierz S: Experiences with respirometric investigation of mitochondria in permeabilized human skeletal and heart muscle fibers: evaluation of defects in pyruvate dehydrogenase and complex I. 3<sup>rd</sup> International Meeting on Human Mitochondrial Pathology (France). September 16-19, 1995.

Gellerich FN, Kraft A, Hertel K, Hein W and Zierz S: Evaluation of the stability of mitochondrial function in skeletal muscle fibers used for detection of mitochondrial encephalomyopathies. 7th Meeting of the European Neurological Society, Rhodos. J Neurol (1997) 244 [Suppl 3]: S44.

Kraft A, Hertel K, Hein W, Gnaiger E, Sperl W, Gellerich FN and Zierz, S: Experiences in the use of skinned muscle fibers for detection of mitochondrial encephalomyopathies: long term stability of mitochondrial function. 70. Kongress der Gesellschaft für Neurologie, Dresden. Akt. Neurologie (1997) 24: S55.

Chen Y, Kraft A, Trumbeckaite S, Opalka JR, Hein W und Gellerich FN: Untersuchungen der Mitochondrienfunktion in permeabilisierten Muskelfasern mit Hilfe der multiplen Substrat-Inhibitor Titration erlaubt die Detektion akuter und hereditärer Veränderungen am Komplex I der Atmungskette. Nervenheilkunde (2001); 20: S44.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. S. Zierz, Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen. Er hat mich über die gesamte Zeit tatkräftig unterstützt und war mir stets ein wichtiger Ratgeber.

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

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

Für das Interesse an der wissenschaftlichen Kooperation, das Anvertrauen der Patienten und das stete Willkommen im Operationssaal danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Hein und seinem Team.

Nicht zuletzt gilt meiner Familie und meinen Freunden mein herzlicher Dank für die Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft, das Verständnis und die Durchsicht des Manuskripts.