

Quantitative histochemische und immunhistochemische Darstellung der
Succinatdehydrogenaseaktivität und der Proteinuntereinheiten in Herz und Lunge der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Verena Hannah Busch
aus Limburg/Lahn

Gießen 2008

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: PD Dr. H. Jomaa

Tag der Disputation: 06.07.09

Meinen Eltern gewidmet

Um große Aufgaben zu erfüllen,
musst du entschlossen sein.

Um kleine Aufgaben zu erfüllen,
musst du aufmerksam sein.

Um schwierige Aufgaben zu erfüllen,
musst du geduldig sein.

Chinesisches Sprichwort

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Grundlagen und Ziele dieser Arbeit	1
1.2. Funktion und Aufbau des Mitochondriums	3
1.3 Die mitochondriale Atmungskette.....	4
1.3.1 NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)	4
1.3.2 Succinatdehydrogenase (Komplex II).....	5
1.3.2.1 Die Succinatdehydrogenase als Teil des mitochondrialen ATP-sensitiven K ⁺ -Kanals	10
1.3.2.2 Mutationen der Succinatdehydrogenase	11
1.3.3 Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III).....	13
1.3.4 Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV).....	14
1.3.5 ATP-Synthase (Komplex V).....	14
1.4 Sauerstoffsensormodelle.....	15
1.4.1 Die Prolylhydroxylase als Sauerstoffsensor	18
1.4.2 Ein Hämprotein als Sauerstoffsensor	19
1.4.3 Ionenkanäle als Sauerstoffsensoren	20
1.4.4 Chemosomen als Sauerstoffsensoren	21
1.4.5 Die NADPH-Oxidase als Sauerstoffsensor.....	22
1.4.6 Mitochondrien als Sauerstoffsensor	24
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Gewebegewinnung	28
2.1.1 Tiere	28
2.1.2 Gewinnung von unfixiertem Gewebe	28
2.1.3 Gewinnung von fixiertem Gewebe	29
2.1.4 Herstellung von Gewebeschnitten	29
2.2 Antikörpergewinnung	30
2.2.1 Datenbankrecherchen.....	30
2.2.2 Antikörperherstellung	31
2.3. Immunhistochemische Verfahren	32
2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz	32
2.3.1.1 Entwicklung der Inkubationsmethode.....	32
2.3.1.2 Optimiertes Inkubationsprotokoll	33
2.4 Immunhistochemische Doppelinkubation	34
2.5 Verwendete Primärantikörper	35
2.6 Verwendete Sekundärantikörper	35
2.7 Präabsorptionskontrolle der immunhistochemischen Markierungen	36
2.8 SDH Histochemie.....	36
2.9 Fluoreszenzmikroskopie.....	37
2.10 Lichtmikroskopie.....	38
2.11 Statistische Methoden.....	38

2.12 Chemikalien und Reagenzien	40
2.13 Lösungen und Puffer	41
2.13.1 Gepuffertes Glycerol.....	41
2.13.2 Histoblocklösung	41
2.13.3 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	41
2.13.4 Phosphatgepufferte Salzlösung +NaCl (PBS+S)	41
2.13.5 Phosphatpuffer 0,1 M (PP).....	41
2.13.6 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2-7,4.....	41
2.13.7 SDH-Medium.....	42
2.13.8 Zamboni-Fixativ	42
3. ERGEBNISSE.....	43
3.1 Antikörpergewinnung und Methodenentwicklung.....	43
3.1.1 SDHA	43
3.1.2 SDHB.....	45
3.1.3 SDHC.....	48
3.1.4 SDHD	50
3.2 Western blot.....	52
3.3 Immunfluoreszenz	53
3.3.1 SDHA	55
Herzmuskelzellen.....	55
KoronargefäÙe.....	55
LungengefäÙe.....	55
Bronchialmuskulatur	55
Bronchialepithel.....	56
Alveolen.....	56
Plurivakuoläres Fettgewebe	56
3.3.2 SDHB-monoklonal	59
Herzmuskelzellen.....	59
KoronargefäÙe.....	59
LungengefäÙe.....	59
Bronchialmuskulatur	59
Bronchialepithel	60
Alveolen.....	60
Plurivakuoläres Fettgewebe	60
3.3.3 SDHB-polyklonal	63
KoronargefäÙe.....	63
LungengefäÙe.....	63
Bronchialmuskulatur	63
Bronchialepithel	63
Alveolen	64
Plurivakuoläres Fettgewebe	64
3.3.4 SDHC	66
3.3.5 Complex V-subunit-α	69
Herzmuskelzellen.....	69
KoronargefäÙe.....	69
LungengefäÙe.....	69
Bronchialmuskulatur	69
Bronchialepithel.....	70
Alveolen.....	70
Plurivakuoläres Fettgewebe	70

3.4 Histochemie	73
3.4.1 SDH-Aktivität (5 Minuten Inkubationszeit)	73
Herzmuskelzellen	73
KoronargefäÙe	73
LungengefäÙe	73
Bronchialmuskulatur	73
Bronchialepithel	74
Alveolen	74
Plurivakuoläres Fettgewebe	74
3.4.2 SDH-Aktivität (40 Minuten Inkubationszeit)	77
3.5 Vergleich der immunhistochemischen und histochemischen Markierungsintensitäten innerhalb der Gewebeanteile	80
3.5.1 KoronargefäÙe	80
3.5.2 Glatte Muskulatur der kleinen LungengefäÙe	81
3.5.3 Glatte Muskulatur der Bronchi	82
3.5.4 Bronchialepithel	84
3.5.5 Alveolarsepten	85
3.5.6 Plurivakuoläres Fettgewebe	86
4. DISKUSSION	87
4.1 Verteilung der SDH in Herz und Lunge	87
4.2 Quantitativer Vergleich der SDH-Untereinheiten innerhalb eines Gewebes	90
4.3 Quantitative Unterschiede im SDH-Gehalt der untersuchten Gewebe	91
4.4 Quantitativer Vergleich des immunhistochemisch darstellbaren Gehalts an SDH-Untereinheiten mit dem des Komplex V	92
4.5 Vergleiche der immunhistochemischen und histochemischen Darstellung	94
4.6 Abschließende Betrachtungen	96
5. ZUSAMMENFASSUNG	98
6. SUMMARY	100
7. LITERATURVERZEICHNIS	102
8. ERKLÄRUNG	113
9. DANKSAGUNG	113
10. LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abkürzungsverzeichnis

3-NPA	3-Nitropropionsäure
Abb.	Abbildung
AM	Absolute Markierungsintensität
ANT	Adenin-Nucleotid-Translokator
ARNT	Aryl-hydrocarbon nuclear translocater
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
BSA	Rinderserum
C	Kohlenstoff
Ca ²⁺	Kalzium
CBP	CREB binding protein
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
Cox	Cytochrom-c-Oxidase
Cu	Kupfer
DEST.	Destilliertes Wasser
DFO	Desferrioxamine
DNP-17	2-(1-Methyl-hexyl)-4,6-dinitrophenol
ETC	Elektronentransportkette
FAD	Flavinadenindinucleotid
Fe ²⁺	Eisen (II) Ionen
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
FIH-1	Factor inhibiting HIF
FMN	Flavinmononucleotid
HIF	Hypoxia inducible factor
HO	Hämoxygenasen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPV	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HQNO	2-n-Heptyl-4-hydroxyquinolin-N-oxid
IPC	ischämischen Präkonditionierung
K ⁺	Kalium

kDa	Kilo Dalton
M	Mol
MEN	multiple endokrine Neoplasie
N	Stickstoff
n	Versuchszahl
NaN ₃	Natriumazid
NBT	Nitroblue Tetrazoliumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH ₂ PO ₄	Potassiumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NOS	Nitritoxidsynthasen
NPA	3-Nitropropionat
O ₂	Sauerstoff
OH-	Hydroxyl
ODD	Oxygen-dependent degradation
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylasen
PIC	Phosphatcarrier
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PP	Phosphatpuffer
QFR	Quinolfumaratreduktase
RGM	Relative gewebsspezifische Markierungsintensität
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S	Schwefel
SDH	Succinatdehydrogenase
SQR	Succinate:Ubiquinon Oxidoreduktase
Tab.	Tabelle
TTFA	2-Theonyltrifluoroaceton
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau

1. Einleitung

1.1 Grundlagen und Ziele dieser Arbeit

Sauerstoff ist ein lebenswichtiges Substrat für jede Säugetierzelle. Zum Schutz vor Hypoxie hat der Säugetierorganismus verschiedene Mechanismen entwickelt, um auf systemischer und zellulärer Ebene den Sauerstoffgehalt kontinuierlich zu messen und mit protektiven Mechanismen auf einen Mangel zu reagieren. Zu solchen Schutzmechanismen gehören z.B. auf systemischer Ebene die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) sowie die reflektorische Hyperventilation und auf zellulärer Ebene eine erhöhte Gentranskription von Wachstumsfaktoren und glykolytischen Enzymen (Chandel et al. 2000, Bell et al. 2005, Prabhakar 2006).

Trotz der zahlreichen Erkenntnisse über die Mechanismen der Sauerstoffmessung in einzelnen Zellen und Organsystemen, konnte noch kein universeller Sauerstoffsensor beschrieben werden. Aktuell werden verschiedene Sauerstoffsensormodelle diskutiert, die durchaus nebeneinander oder als funktionelle Einheit in der Zelle vorkommen können (Chandel et al. 2000, Lahiri et al. 2000, Bell et al. 2005).

Als Kandidaten der Sauerstoffsensoren gelten die Prolylhydroxylase, die u.a. den Transkriptionsfaktor HIF (hypoxia inducible factor) reguliert (Acker&Acker 2004, Bell et al. 2005), die NAD(P)H-Oxidasen als nicht-mitochondriale ROS-Produzenten (reaktive Sauerstoffspezies) (Chandel et al. 2000, Lopez-Barneo et al. 2004, Keating et al. 2005, Prabhakar 2006), ein Häm-enthaltendes Protein, das bei Hypoxie über Konformationsänderungen einen Signalweg einleitet (Kroll et al. 1998, Lahiri et al. 1999, Acker&Acker 2004, Prabhakar 2006), K⁺-Kanäle, deren Öffnungswahrscheinlichkeit bei Hypoxie über Änderung des Redoxniveaus in der Zelle beeinflusst wird (Perez-Garcia et al. 1999, Chandel et al. 2000, Keating et al. 2005, Prabhakar 2006), und die Komplexe I, II, III und IV der mitochondrialen Atmungskette (Streller et al. 2002, Hoppeler et al. 2003, Paddenberg et al. 2003, Lopez-Barneo et al. 2004, Giaccia et al. 2004, Bell et al. 2005). Das besondere Interesse dieser Arbeit gilt dem Komplex II der Atmungskette, der Succinatdehydrogenase.

Die Succinatdehydrogenase (SDH) ist sowohl ein Teil des Zitratzyklus, wo sie die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert, als auch ein Teil der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETC), in der sie als Komplex II die von der Succinatoxidation stammenden zwei Elektronen auf Ubiquinon in der inneren Mitochondrienmembran überträgt (Hägerhäll 1997, Roy et al. 2000). Verschiedene Studien liefern Hinweise, dass Komplex II in die Sauerstoffmessung der Zelle involviert ist.

Untersuchungen an familiären Paragangliomen und Phäochromozytomen zeigten einen Defekt in den Genen der SDH-Untereinheiten B, C und D. Diese Tumore ähneln stark der benignen Hyperplasie des Glomus caroticum, ausgelöst durch chronische Hypoxie (Pollard et al. 2003, Astuti et al. 2004, Pawlu et al. 2005). Paddenberg et al. (2003) konnten zeigen, dass bei Hypoxie die Aktivität des Komplex II sowie die ROS-Produktion in den Lungengefäßen zunimmt. Die SDH-Aktivität nimmt dagegen ab (Paddenberg et al. 2003, 2006). Bei Zugabe von Succinat, dem Substrat der Fumaratreduktase, zu isolierten Mitochondrien aus Leberzellen der Ratte kommt es unter Hypoxie zu einer Abnahme der ROS-Produktion, der SDH-Inhibitor Malonat dagegen zeigt keinen Effekt (McLennan et al. 1999). Diese Beobachtung stärkt die Hypothese, dass die SDH unter Hypoxie ihre enzymatische Aktivität umkehrt und als Fumaratreduktase agiert (Paddenberg et al. 2003), so wie es in einigen anaeroben Organismen, die Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen, der Fall ist (Yu et al. 1987, Hägerhäll 1997).

Sollte die SDH als Sauerstoffsensoren fungieren, bleibt noch zu klären, ob dies für alle Zellen gilt, oder nur für spezifische Zellsysteme, da nicht alle Mitochondrien einen funktionellen Komplex II enthalten. Hajos et al. (1971) und Szentagothai (1957) fanden zwar in den Mitochondrien der Perikarya und den Dendriten von Nervenzellen eine SDH-Aktivität, aber nicht in denen der axonalen Endigungen. Thaete et al. (1990) konnten eine histochemisch nachweisbare SDH-Aktivität in der Lunge lediglich in den Kardiomyozyten der Venen, im Bronchialepithel und in der glatten Muskulatur nachweisen. Die anderen in der Lunge vertretenen Zelltypen zeigten keine histochemische SDH-Aktivität. Es bleibt zu klären, ob diese Ergebnisse sich ausschließlich auf die Aktivität der SDH beziehen, oder ob Teile des Enzyms, womöglich auch das komplette Enzym in diesen Zellen und Zellkompartimenten fehlt.

Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob die Komplex II-Untereinheiten in allen Zelltypen von Herz und Lunge exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden polyklonale Antikörper gegen die SDH-Untereinheiten hergestellt und in Kombination mit monoklonalen Antikörpern gegen die Untereinheit B für die immunhistochemische Untersuchung von Herz und Lunge genutzt. Mit einem Markerantikörper für glatte Muskelzellen (Anti- α -smooth muscle actin) wurden Doppelmarkierungen zur Identifikation von einzelnen Zelltypen durchgeführt. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist es zu klären, ob die SDH-enthaltenden Zellen eine zur Proteinmenge korrelierende, histochemisch nachweisbare Enzymaktivität zeigen.

1.2. Funktion und Aufbau des Mitochondriums

Mitochondrien sind Zellorganellen, deren Funktionen die Energiebereitstellung für die Zelle, metabolische Aufgaben und die Regulation des apoptotischen Zelltods sind (Benitez-Briebiesca et al. 2000). Die Hauptaufgabe der Mitochondrien ist der oxidative Stoffwechsel, d.h. die Bereitstellung von ATP über den Zitratzyklus und die Atmungskette. Sie decken auf diesem Wege 90% des ATP-Bedarfs der Zelle (Pollard et al. 2003).

Die Mitochondrienstruktur variiert stark innerhalb der verschiedenen Zelltypen. Sie können als einzelne, längliche Organellen vorliegen, zwischen einem und vier Mikrometer groß, aber auch in Verbänden als verzweigte Netzwerke. Allen Formen gemein ist die Doppelmembran. Man unterscheidet eine äußere Mitochondrienmembran, die das Mitochondrium umhüllt und vom Zytoplasma abgrenzt, von der inneren Mitochondrienmembran. Diese liegt der äußeren Membran an und ist nur durch den Intermembranspalt von ihr getrennt. Die äußere Mitochondrienmembran besteht zu 50% aus Lipiden und enthält eine Reihe von Enzymen, die unterschiedlichste Aufgaben im Stoffwechsel erfüllen. Durchsetzt ist die Membran mit Porinen, integralen Proteinen mit einem Kanal im Inneren von etwa 2-3 nm, der von einer β -Faltblatt-Fasstruktur umgeben ist. Die Zelle hat die Möglichkeit, diese Tunnelproteine je nach Bedarf zu schließen und zu öffnen und so ihren Stoffwechsel zu regulieren (Karp 2005). Die innere Mitochondrienmembran bildet Einstülpungen in die Matrix des Mitochondriums, die so genannten Cristae. Diese Cristae stellen den größten Teil der inneren Membranoberfläche, an der die Zellatmung und ATP-Bildung stattfindet (Carr et al. 2005). Aufgebaut ist die innere Mitochondrienmembran, wie auch die äußere Mitochondrienmembran, aus Lipiden, besitzt aber im Gegensatz zur äußeren Membran einen höheren Anteil an Polypeptiden (über 100 verschiedene) und ist auf Grund ihres membranstabilisierenden Kardiolipingehaltes sehr impermeabel. Moleküle können nur mit Hilfe spezieller Transportsysteme in die Matrix übertreten.

Die mitochondriale Matrix enthält verschiedene Enzyme, Ribosomen und ringförmige DNA-Moleküle, die das mitochondriale Genom darstellen und mitochondriale Proteine (Proteine des oxidativen Stoffwechsels), ribosomale DNA und Transfer-RNA kodieren (Karp 2005).

1.3 Die mitochondriale Atmungskette

Die ETC, auch Atmungskette genannt, der Säugetiere ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und besteht aus fünf Multiproteinkomplexen, der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat-Ubiquinon-Reduktase (Komplex II), der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III), der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und der F1-F0-ATP-Synthase (Komplex V). Diese Enzymkomplexe oxidieren NADH und FADH₂ und transferieren über Oxidations- und Reduktions-Reaktionen schrittweise Elektronen auf O₂. Dabei werden Protonen durch einen gerichteten Protonentransport von der Matrix- auf die Zytosolseite der inneren Mitochondrienmembran gepumpt. Den dadurch entstehenden elektrochemischen Protonengradienten nutzt die F1-F0-ATP-Synthase, um ATP aus ADP und Phosphat zu synthetisieren (Nishihawa et al. 2000, Cawthon et al. 2001, Schägger et al. 2004).

1.3.1 NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

Die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I) katalysiert den ersten Schritt der Atmungskette. Sie oxidiert NADH in der Matrix und transferiert die Elektronen über Flavinmononucleotid (FMN) und eine Reihe von Eisen-Schwefel-Clustern zu Ubiquinon in der inneren Mitochondrienmatrix. Komplex I ist zusammengesetzt aus 45 Polypeptiden, 8 Eisen-Schwefel-Clustern und einem nicht-kovalent gebundenen FMN (Carroll et al. 2006). Sieben der Untereinheiten der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase sind in der mitochondrialen DNA kodiert, die restlichen Untereinheiten im Zellkern (Flemming et al. 2002, Crimi et al. 2004, Nussbaum et al. 2005, Carroll et al. 2006). Der Komplex besitzt eine L-Form, wobei sich der hydrophobe, horizontale Anteil in der inneren Membran befindet und der vertikale periphere Anteil zur Matrix zeigt (Fearnley et al. 2001, Nussbaum et al. 2005, Carroll et al. 2006). Des Weiteren kann der Komplex in 4 Subkomplexe aufgeteilt werden: 1 α , 1 β und 1 γ , 1 λ . 1 λ entspricht dem peripheren Arm und enthält 14 Untereinheiten, die NADH-Bindungsstelle, FMN und alle bekannten Redoxfaktoren. 1 α bestehend aus 1 λ und 9 zusätzlichen Membranuntereinheiten, 1 β mit 13 Untereinheiten und 1 γ mit 6 Untereinheiten bilden zusammen den Membranarm des Komplexes (Carroll et al. 2006). FMN übernimmt die Elektronen von NADH und leitet sie über die Eisen-Schwefel-Cluster zu Ubiquinon in der inneren Mitochondrienmembran. Während dieses Elektronentransfers werden vier Protonen von der Matrix über die innere Membran in den Intermembranspalt gepumpt und es entsteht

ein elektrochemischer Protonengradient, der für die ATP-Synthese genutzt wird (Flemming et al. 2003, Nussbaum et al. 2005, Carroll et al. 2006).

1.3.2 Succinatdehydrogenase (Komplex II)

Die Succinatdehydrogenase, oder Succinat:Ubiquinon Oxidoreduktase (SQR) genannt, der Säugetiere ist ein Enzym sowohl des Zitratzyklus als auch der Atmungskette und erfüllt somit eine duale Funktion in der Zelle. Im Zitratzyklus katalysiert sie die Oxidation von Succinat zu Fumarat und überträgt die freigesetzten Elektronen als Komplex II der Atmungskette auf Ubiquinon (Coenzym Q) (Hägerhäll 1997, Roy et al. 2000, Sun et al. 2005).

SDH wird vollständig vom nukleären Genom kodiert und ist zusammengesetzt aus 4 Untereinheiten (Tomitsuka et al. 2003), bestehend aus einem peripheren, löslichen, hydrophilen Heterodimer und einer hydrophoben, integralen Membrandomäne, die die inneren Mitochondrienmembran überspannt und die löslichen Domänen dort verankert (Hägerhäll 1997, Sun et al. 2005). Das SDHA-Gen befindet sich auf Chromosom 5p15, das SDHB-Gen auf Chromosom 1p36, das SDHC-Gen auf Chromosom 1q21-23 und das SDHD-Gen auf Chromosom 11q23 (Morris et al. 1996).

Die periphere Domäne enthält die Dicarboxylbindungsstelle und besteht aus den zwei Untereinheiten SDHA und SDHB. Sie ist der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran zugewandt (Hägerhäll 1997).

SDHA (Fp oder Flavoproteinuntereinheit) besitzt ein Molekulargewicht von 64-79 kDa und ist zusammengesetzt aus 622 Aminosäuren (AS) (A1-A622) (Horsefield et al. 2004, Sun et al. 05). Sie enthält die Dicarboxylbindungsstelle, die von einem Isoalloazinring, einer Histidinseitenkette (His A369), zwei Argininseitenketten (Arg A301, Arg A404) und einer Seitenkette von Phe A141 gebildet wird (Roy et al. 2000).

FAD als Cofaktor ist durch einen Histidinrest über das N(3)-8- α -Riboflavin sowie über Wasserstoffbrückenbindungen zu verschiedenen AS der Haupt- und Seitenketten (A10-A273, A361-A445) der Untereinheit kovalent gebunden und dient dem Komplex als prosthetische Gruppe (Sun et al. 2005). FAD ist nahe der Substratbindungsseite lokalisiert und mit seiner Funktion als 2-Elektronencarrier der erste Elektronenakzeptor während der Succinatoxidation (Hägerhäll 1997).

SDHB (Ip oder Eisenschwefelprotein), mit einem Molekulargewicht von 24-31 kDa, besteht aus insgesamt 252 AS (B1-B252) und ist zusammengesetzt aus drei Eisen-Schwefel-Clustern: [2Fe-2S] (S1), [4Fe-4S] (S2) und [3Fe-4S] (S3), die über Cysteinreste gebunden sind (Hägerhäll 1997, Horsefield et al. 2004, Sun et al. 05). Die Cluster bilden eine fast lineare Kette für den effizienten Elektronentransport von FAD zu der Quinonbindungsstelle (Horsefield et al. 2004). Das niedrige Redoxpotenzial des S2 Clusters (verglichen mit dem der anderen Cluster) erhöht die Energiebarriere für den Elektronentransfer und verhindert den Elektronenrückfluss in die umgekehrte Richtung (Sun et al. 2005). Cluster S3 ist verantwortlich für die Anbindung von Ip und Fp an den Membrananker und fungiert als Elektronenakzeptor/~Donor. Die Cysteinreste stabilisieren die sterische Anordnung der Cluster und erniedrigen die Sauerstoffsensitivität. Weiterhin lässt sich Ip in zwei Domänen aufteilen: eine N-terminale Domäne, die den Cluster S1 bindet, und in eine C-terminale Domäne, die die Cluster S2 und S3 bindet (Hägerhäll 1997, Roy et al. 2000, Sun et al. 2005).

Die integrale Membrandomäne als hydrophober Anteil des Enzyms besteht, wie die periphere Domäne, aus 2 Untereinheiten (SDHC und SDHD) und verankert die periphere Domäne an der inneren Mitochondrienmembran. Sie enthält die Ubiquinonbindungsstelle sowie ein Häm als prosthetische Gruppe und ist verantwortlich für die Reduktion und Oxidation des Ubiquinons (Hägerhäll 1997, Sun et al. 2005).

SDHC (CybL) besteht aus 140 AS (C1-C140) und hat ein Molekulargewicht von 13-18 kDa. Sie ist aufgebaut aus fünf antiparallelen, transmembranen Helices (1L-5L) (Sun et al. 2005) mit jeweils einem N-Terminus zur Matrixseite und einem C-Terminus zum Intermembranspalt. Den N-Terminus bildet die Helix 1L und interagiert mit Ip. Zusammen mit Helices der anderen Membranuntereinheit bilden die Helices von SDHC geladenen Strukturen, die wichtig für die Interaktionen mit der peripheren Domäne und für die Reaktion mit Ubiquinon sind (Hägerhäll 1997).

SDHD (CybS), mit einem Molekulargewicht von 11-16 kDa, ist die kleinste Untereinheit des Enzyms und besteht aus 103 AS (D1-D103). Die AS bilden vier antiparallele, transmembrane Helices (1S-4S), die mit den Helices von SDHC interagieren. Wie auch SDHC, besitzt SDHD einen C-Terminus angeordnet zum Intermembranspalt und einen N-Terminus zur Matrixseite (Hägerhäll 1997, Roy et al. 2000).

Die Ubiquinonbindungsseite (Qp) nahe der Matrixseite wird von den Helices 2L (C38-C52) und 2S (D77-D91) der beiden hydrophoben Untereinheiten und der [3Fe-4S] bindenden Region (B214-B219 und B166-B175) von Ip gebildet. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen B173, D91 und dem ersten Sauerstoffatom des Ubiquinons sind verantwortlich für die Bindungsspezifität. D90 und C46 spielen wahrscheinlich eine funktionelle Rolle bei der Reduktion des Ubiquinons; welche genau, ist bisher nicht bekannt.

Auf Grund von Studien mit dem Inhibitor TTFA (2-Theonyltrifluoroacetone) wird ebenfalls das Vorhandensein einer zweiten Ubiquinonbindungsseite (Qd) gegenüber der Qp-Seite an der Membran diskutiert. Diese Seite, gebildet von einer Schleife zwischen Helix 1S und 2S sowie Helix 4S und dem C-Terminus von 5L und gesäumt von D143, D135 und D61, könnte ähnlich agieren wie die Qp-Bindungsseite, allerdings mit einer niedrigeren Bindungsaffinität zu Ubiquinon (Hägerhäll 1997, Cecchini et al. 2003, Horsefield et al. 2004, Sun et al. 2005).

Die Häm-Gruppe (Cytochrom b 560) (Yu et al. 1987, Paddenberg et al. 2006) ist eingebettet in der transmembranen Region unterhalb der gebundenen Helices 2L, 4L, 1S und 2S, verankert durch zwei Phospholipide, und interagiert mit Imidazolresten von zwei Histidinen (His C101 und His D79) (Hägerhäll 1997). Häm ist nicht direkt in die Kette der Redoxzentren des Enzyms mit einbezogen und seine genaue Rolle ist noch unklar. Möglicherweise hilft es, die Elektronen in der Membran zu halten und wirkt protektiv auf die Bildung von ROS (Horsefield et al. 2004). Eine andere Aufgabe des Häms könnte die Stabilisation der Ubiquinonbindungsstelle und die Regulation des Elektronenflusses sein (Hägerhäll 1997). Durch Mutationsstudien konnte bisher bestätigt werden, dass Häm eine essenzielle Rolle bei dem funktionellen Aufbau und der strukturelle Stabilität der Membrananker spielt (Horsefield et al. 2004).

Die strukturelle Stabilität des Komplexes wird hauptsächlich von dem Ip-Protein getragen, da zwischen Fp und den Membranankern kaum direkte Interaktionen stattfinden. Ip steht mit dem Fp-Protein sowie auch mit den Membranankern über eine große Interaktionsfläche in Verbindung.

Die Interaktionen der vier Untereinheiten bestehen größtenteils aus hydrophoben Bindungen. Hauptsächlich über den [3Fe-4S] Cluster (Ackrell 2000) interagiert Ip mit der Helix 1L (C6-C34) am N-Terminus von SDHC (Sun et al. 2005).

Die transmembranen Helices 2L und 4L sowie 1S und 2S sind aneinander gebunden und verbinden somit die zwei Ankeruntereinheiten. Umgeben sind sie von den Helices 5L und 3S.

Die antiparallelen Helices 3L und 4S bilden eine geschlossene Struktur innerhalb der gebundenen vier Helices und bilden einen geladenen Abschnitt entlang der Membran in den Intermembranspalt. Die Verbindung von 1L mit dem Rest des Membranankers wird lediglich über C22-C35 vermittelt und ist entscheidend für die innere Stabilität und richtige Zusammensetzung des Komplexes bei dessen Entstehung. Ebenso wichtig für die innere Stabilität des Komplexes sind vier parallele aromatische Reste der AS C100, C96, C92 und C88 der Helix 4L, die die Helixstrukturen stabilisieren (Sun et al. 2005).

SDH wird wie viele Enzyme des Stoffwechsels über das Substratangebot geregelt. Durch Anstieg von Succinat wird die SDH-Aktivität gesteigert, Oxalacetat und Malonat hemmen die Aktivität der SDH (Gutman 1975, Maklashina et al. 2004).

Künstliche Inhibitoren der SDH sind TTFA, 3-Methylcarboxin, HQNO (2-n-Heptyl-4-hydroxyquinolin-N-oxid) (Hägerhäll 1997, Sun et al. 2005), DNP-17 (2-(1-Methyl-hexyl)-4,6-dinitrphenol) und NPA (3-Nitropropionat) (Horsefield et al. 2004). Oxalacetat und NPA sind Inhibitoren der Substratbindungsseite. Durch seine sterische Ähnlichkeit zu Succinat bindet Oxalacetat am aktiven Zentrum des Enzyms und schützt über kompetitive Hemmung bei einem Überangebot von Substraten den Organismus vor einer Überaktivierung des Zitratzykluses. NPA ist isoelektrisch zu Succinat und bindet unter Bildung einer kovalenten Bindung irreversibel an das N5 Atom des FADs (Sun et al. 2005). TTFA, HQNO, DNP-17 und 3-Methylcarboxin sind Inhibitoren der Quinonbindungsstelle. 3-Methylcarboxin und TTFA blocken die Reoxidation des reduzierten Clusters S3 durch Inhibition der Quinonreduktaseaktivität. Somit kann Quinon nicht mehr umgesetzt werden. Sie haben jedoch keinen Einfluss auf die Succinatumsetzung, die immer noch stattfinden kann (Tan et al. 1993, Hägerhäll 1997). 3-Methylcarboxin kann nur binden, wenn Ip und Fp an den Ankeruntereinheiten gebunden sind. DNP-17 und HQNO als Quinonanaloga verhindern die direkte Bindung des Quinons an die Quinonbindungsstelle (Hägerhäll 1997).

Man kann Succinat:Ubiquinon Oxidoreduktasen (SQR) in 3 funktionelle Klassen einteilen. Zu der Klasse 1 zählen alle SQRs, die Succinat mit einem hohen Quinolpotenzial, meist mit Ubiquinon, oxidieren und reduzieren. Zu dieser Klasse zählt man alle mitochondrialen SQRs der Säugetiere. Die Klasse 2 beinhaltet alle Quinolfumaratreduktasen (QFR). QFR ist ein Enzym, welches in anaeroben Organismen Succinat zu Fumarat reduziert, das als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette fungiert. SQR und QFR sind sehr ähnlich in Struktur und Zusammensetzung (Aminosäuresequenz) und können jeweils beide Reaktionen

Succinat zu Fumarat und Fumarat zu Succinat katalysieren. Die in Klasse 2 zusammengefassten QFRs katalysieren die Oxidation mit Menaquinol oder Rhodoquinol, welche ein niedriges Quinolpotenzial haben. SQRs, die die Succinatoxidation und – Reduktion mit Quinonen mit einem niedrigen Quinonpotenzial, wie z.B. Menaquinon oder Thermoplasmaquinon katalysieren, werden in die Klasse 3 eingeteilt. Klasse 3 Enzyme katalysieren eine „Bergauf-Reaktion“, d.h. der finale Elektronenakzeptor hat ein niedrigeres Redoxpotenzial als das Succinat/Fumaratpaar und die Reaktion ist energetisch nicht vorteilhaft. Hierzu gehören eine Reihe von SQRs von grampositiven Bakterien und Archaeobakterien, z.B. *B. subtilis* (Lancaster et al. 2002, Hägerhäll 1997).

Des Weiteren kann man Succinat:Ubiquinon Oxidoreduktasen basierend auf der Anzahl der Untereinheiten und des Häm-Gehalts in fünf Typen (A-E) einteilen.

Innerhalb der verschiedenen Spezies haben die hydrophilen Untereinheiten A und B, im Gegensatz zu den hydrophoben Untereinheiten C und D, eine hohe Sequenzhomologie. Der hydrophobe Membrananker besteht je nach Spezies aus zwei kleinen Polypeptiden, wie es bei der Säugetier-SQR der Fall ist, oder aus einer großen Untereinheit, die sich im Laufe der Evolution aus den beiden kleineren durch Fusion gebildet hat. Typ A SQRs enthalten zwei hydrophobe Untereinheiten und zwei Häm-Gruppen. Zu dieser Gruppe gehört z.B. die SQR von vielen Archaeobakterien.

Typ B Enzyme enthalten eine hydrophobe Untereinheit und zwei Häm-Gruppen, z.B. SQR von grampositiven Bakterien wie *B. subtilis*. Die mitochondrialen SQRs von Säugetieren zählen zu den Typ C Enzymen, die zwei hydrophobe Untereinheiten und eine Häm-Gruppe besitzen. Die QFR von *E. coli* zählt zu den Typ D Enzymen, die zwei hydrophobe Untereinheiten besitzen, aber keine Häm-Gruppe. Typ E Enzyme besitzen ebenfalls keine Häm-Gruppe, aber zwei hydrophobe Untereinheiten, genannt SDHE und SDHF, die sich sehr stark von den Untereinheiten der anderen Typen in Aufbau und Zusammensetzung unterscheiden. Sie enthalten außerdem einen zusätzlichen [4Fe-4S] Cluster, der wahrscheinlich den [3Fe-4S] Cluster ersetzt (Hägerhäll 1997, Roy et al. 2000, Lancaster et al. 2002).

Mutationen in den Genen der SDH-Untereinheiten und die daraus resultierenden Phänotypen sprechen für eine wichtige Rolle der SDH bei der Sauerstoffmessung und der daraus resultierenden Hypoxieantwort. Tumore des Glomus caroticum als Zentralorgan der arteriellen Sauerstoffmessung zeigen ähnliche Veränderungen wie das Glomus von Individuen, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt wurden (Piruat et al. 2004). Mutationen der Eisen-Schwefel-Cluster steigerten in einem Bakterienhomolog von Komplex II die

Produktion von ROS um ein Vielfaches (Cecchini et al. 1995). Bei Hähnchen mit chronisch pulmonalem Hochdruck zeigte sich ein Defekt in Komplex II mit vermehrter Produktion von ROS (Cawthon et al. 2001). Auf Grund einer exzessiven ROS-Produktion, ausgelöst durch Mutationen des Cytochrom b-Gens des Komplexes II, verkürzte sich deutlich die Lebensdauer von *C. elegans*. Eine erhöhte Komplex II-Aktivität wurde auch in Säugetierzellen bei hypoxiebedingter Apoptose der Zelle beschrieben (McLennan et al. 2001).

1.3.2.1 Die Succinatdehydrogenase als Teil des mitochondrialen ATP-sensitiven K⁺-Kanals

Die SDH katalysiert im Zitratzyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat und überträgt Elektronen als Komplex II der Atmungskette auf Komplex III. Eine Studie von Ardehali et al. (2004) liefert jedoch Hinweise, dass die SDH eine weitere Funktion als ein Teil des mitochondrialen ATP-sensitiven K⁺-Kanals (mitoK_{ATP}) in der Zelle hat.

Der ATP-sensitive K⁺-Kanal ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und spielt wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Apoptose und der ischämischen Präkonditionierung (IPC) der Zelle. Ischämische Präkonditionierung ist ein endogener Prozess, bei dem die Zelle, ausgelöst durch eine kurze Ischämieattacke, Mechanismen entwickelt, die gegen zukünftige Ischämie schützen. Der genaue molekulare Mechanismus der IPC ist bisher noch nicht bekannt (Ardehali et al. 2004).

Das Antihypertensivum Diazoxide schützt Kardiomyozyten vor dem Zelluntergang durch einen Mechanismus ähnlich der IPC, aber ohne vorherige Ischämieattacken, und ist in niedrigen Dosen ein Agonist des mitochondrialen ATP-sensitiven K⁺-Kanals. Diese Erkenntnis unterstützt die Annahme, dass der mitoK_{ATP} die Zelle vor den Folgen einer Ischämie schützt, indem er die Apoptose hemmt. Diazoxide senkt des Weiteren in hohen Dosen die Succinatoxidation. Da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition der SDH kardioprotektive Effekte hat, wirkt Diazoxid möglicherweise kardioprotektiv über eine Inhibierung der SDH bei gleichzeitiger Aktivierung des mitoK_{ATP}. Ardehali et al. (2004) identifizierten in ihrer Studie einen Multiproteinkomplex in der inneren Mitochondrienmembran, zusammengesetzt aus dem mitochondrialen ATP-Bindungsprotein 1 (mABC1), einem Phosphatcarrier (PIC), einem Adenin-Nucleotid-Translokator (ANT) und einer mit SDH assoziierten ATP-Synthase, der eine mitoK_{ATP}-Aktivität zeigte.

Diese Kanalaktivität zeigte sich sensitiv sowohl auf mitoK_{ATP}-Liganden, als auch auf SDH-Inhibitoren. Auf Grund der funktionellen und pharmakologischen Überlappungen zwischen der SDH und des mitoK_{ATP} vermuten Ardehali et al. (2004), dass die SDH als Teil des mitoK_{ATP} dessen Funktion reguliert, und somit neben ihrer Rolle in der ETC und im Zitratzyklus eine weitere Funktion im Zellstoffwechsel hat.

1.3.2.2 Mutationen der Succinatdehydrogenase

Defekte der Mitochondrienfunktion sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie Myo- und Enzephalopathien, vorzeitiger Alterung, Erkrankungen des Alters, wie Demenz und Morbus Parkinson und Tumorentstehung assoziiert (Pollard et al. 2003, Piruat et al. 2004).

Mutationen der vier Untereinheiten der SDH werden mit der Entstehung von Paragangliomen und Phäochromozytomen in Verbindung gebracht, was für eine primäre Rolle der SDH in der Tumorgenese spricht (Pollard et al. 2003, Astuti 2004, Piruat et al. 2004, Pawlu et al. 2005, Bayley et al. 2005).

Mutationen der hydrophilen, katalytischen Untereinheit SDHA führen zu einer Dysfunktion des Energiestoffwechsels (Pawlu et al. 2004). Das Leigh-Syndrom, hervorgerufen durch eine Mutation der Untereinheit A der SDH, ist eine neurodegenerative Erkrankung des Kindesalters, die durch symmetrische, nekrotische Läsionen des Hirnstamms, der Basalganglien und des Thalamus gekennzeichnet ist. Hauptsymptome sind eine psychomotorische Retardierung, Ataxie, Optikusatrophie, Wachstumshemmung, rezidivierendes Erbrechen, Krampfanfälle mit Atemnot sowie eine intermittierende Lactacidose im Liquor und im Blut (Bourgeron et al. 1995, Pollard et al. 2003, Crimi et al. 2004).

Im Gegensatz zu SDHA-Mutationen zeigen Mutationen der anderen Untereinheiten (SDHB, SDHC, SDHD) einen komplett anderen Phänotyp in Form von Paragangliomen und Phäochromozytomen. Paragangliome sind langsam wachsende, meist benigne, hormonell inaktive, hypervaskularisierte Tumore, die von neuroektodermalen Zellen abstammen und meist vom Glomus caroticum ausgehen, oder in anderen Regionen des Kopf-Halsbereichs lokalisiert sind. Dreißig Prozent der Paragangliome sind erblicher Genese und zeigen gegenüber der nicht-erblichen Variante eine stärkere Ausprägung mit einem Erkrankungsbeginn in jüngeren Jahren und multiplen Tumorlokalisationen (Gimenez-Roqueplo et al. 2001, Pollard et al. 2003, Piruat et al. 2004, Pawlu et al. 2005).

Bei Phäochromozytomen handelt es sich ebenfalls um größtenteils benigne (nur 13-26 % sind maligne), hypervaskularisierte Tumore, die meist von den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und retroperitonealen Paraganglien stammen, in 10 % aller Fälle aber auch von sympathischen Ganglien, und hormonaktiv in Form von Katecholaminproduktion sind (Maher et al. 2002, Pollard et al. 2003, Astuti et al. 2004, Pawlu et al. 2005). Sie treten auch bei anderen erblichen Erkrankungen wie MEN 2 (multiple endokrine Neoplasie Typ 2), VHL-Syndrom (von Hippel-Lindau-Syndrom) und Neurofibromatose Typ II auf (Maher et al. 2002, Young et al. 2002). Man unterscheidet eine familiäre und eine sporadische sowie eine uni- und bilaterale Form der Paragangliome und Phäochromozytome, wobei die familiäre und bilaterale Form stärker mit Mutationen der Untereinheiten SDHB und -D assoziiert ist (Astuti et al. 2003).

Mutationen des SDHB-Gens wurden in zwei von fünf Familien mit erblichem Phäochromozytom gefunden sowie in zwei von drei Familien mit erblichem Phäochromozytom und Kopf-Hals-Paragangliom, dagegen nur in einem von 24 Individuen mit sporadischem Phäochromozytom (Maher 2002). Die erblichen Phäochromozytome und Paragangliome zeigten gegenüber der sporadischen Variante eine deutlich höhere Aggressivität in Wachstum und Katecholaminausschüttung (Pawlu et al. 2005).

Neben SDHB-Mutationen gelten auch SDHD-Mutationen als Auslöser für Phäochromozytome und Paragangliome, speziell für Paragangliome des Kopf-Hals-Bereichs (Astuti et al. 2003). Für das familiäre, erbliche Paragangliom ist eine SDHD-Mutation der Hauptauslöser und somit ist das SDH-Gen das erste bekannte Tumorsuppressorgen, das ein mitochondriales Protein kodiert (Gimenez-Roqueplo et al. 2001, Piruat et al. 2004). Ein komplettes Fehlen der SDHD ist schon während der embryonalen Entwicklung tödlich, was an SDHD-knock-out-Mäusen gezeigt werden konnte (Piruat et al. 2004). Familiäre SDHD-Mutationen zeigen eine elternabhängige Penetranz (Astuti et al. 2004) und führen nur zu einer Erkrankung, wenn das defekte Allel vom Vater vererbt wurde. Stammt das Allel jedoch von der Mutter, sind die Individuen nur asymptotische Träger (Pawlu et al. 2005).

Eine Mutation der SDHC wurde bisher nur in einer Familie mit Paragangliomen beschrieben, was für eine geringere Beteiligung an der Entstehung von Paragangliomen spricht (Maher et al. 2002). In *C. elegans* führt dagegen eine Mutation der SDHC zu einer 80 %igen Reduktion der Komplex II-Aktivität (Ishii et al. 1998), diese sind jedoch im Gegensatz zu SDHD-knock-out Mäusen auch in der homozygoten Form lebensfähig (Piruat et al. 2004).

Typisch für Paragangliome und Phäochromozytome ist die hohe Vaskularisierung der Tumore.

Das Glomus caroticum von Individuen, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt waren, zeigte die gleichen Veränderungen wie die durch Defekt der SDH-Untereinheiten ausgelösten Paragangliome (Baysal et al. 2000, Piruat et al. 2004). Daraus lässt sich schließen, dass die Tumorgenese bei Paragangliomen mit einer Aktivierung des zellulären Hypoxiesignalwegs verbunden ist. Ein Aktivitätsverlust des Komplexes II von bis zu 90 % könnte ein Grund sein für das Auftreten einer Pseudohypoxie in der Zelle mit anschließender Aktivierung des hypoxischen Signalwegs über gesteigerte ROS-Bildung und HIF-Aktivierung (Pollard et al. 2003, Decker et al. 2003, Pawlu et al. 2005).

Dies spricht für eine entscheidende Rolle des Komplexes II in der Sauerstoffmessung der Zelle (Maher et al. 2002, Astuti et al. 2003, Pawlu et al. 2005).

1.3.3 Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III)

Die Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase, auch Cytochrom-bc₁-Komplex genannt, ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, wo sie gebunden an eine Protonenverschiebung in den Intermembranspalt Ubiquinon zu Ubiquinol oxidiert und die Elektronen weiter auf Cytochrom-c transferiert. Der Enzymkomplex besteht aus elf Untereinheiten (Huang et al. 2005), von denen die drei Redoxuntereinheiten, Cytochrom b mit zwei nicht-kovalent gebundenen Häm b-Gruppen (b 562 und b 566), Cytochrom c₁ mit einer kovalent gebundenen Häm c-Gruppe und ein Rieske-Typ 2Fe-2S-Cluster, den katalytischen Kern des Enzyms bilden (Trumpower 1990, Palsdottir et al. 2003, Huang et al. 2005).

Cytochrom-bc₁ besitzt zwei verschiedene Ubiquinonbindungsstellen, eine nahe der Matrixseite und eine an der zytosolischen Seite. Ein Elektron von Ubiquinon wandert über das Eisen-Schwefel-Protein und Cytochrom c₁ zu Cytochrom c. Dabei werden zwei Protonen von Ubiquinol über die innere Membran in den Intermembranspalt gepumpt. Das andere Elektron reduziert das Ubiquinon zu Semiquinon und gelangt dann über Häm b₅₆₂ und Häm b₅₆₆ auf das matrixnahe Ubiquinon, welches zwei Protonen aus dem Matrixraum und ein Elektron von Komplex I aufnimmt und so wieder zu Ubiquinol reduziert wird. Ein zweites Molekül Ubiquinon gibt ein Elektron ab, das wiederum den oben beschriebenen Reaktionsweg durchläuft, dann aber auf das zytosolnahe Ubiquinon übertragen wird, und dieser so genannte Q-Zyklus läuft von vorne ab. In einem kompletten katalytischen Q-Zyklus werden durch Oxidation eines Ubiquinons zwei Moleküle Cytochrom c reduziert und 4 Protonen in den Intermembranspalt gepumpt (Trumpower 1990, Palsdottir et al. 2003, Crofts et al. 2003, Cape et al. 2005, Esser et al. 2006).

1.3.4 Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV)

Die Cytochrom c-Oxidase (Cox) ist der terminale Enzymkomplex der Atmungskette und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Sie katalysiert den Transfer von Elektronen von Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff und pumpt dabei acht Protonen in den Intermembranspalt. Komplex IV ist zusammengesetzt aus 13 Untereinheiten, von denen die drei größten vom mitochondrialen Genom und die anderen zehn vom Kern kodiert werden (Hanson et al. 2001, Carr et al. 2005).

Cytochrom c-Oxidase besitzt vier redoxaktive prosthetische Gruppen: Cytochrom a mit einer Häm a-Gruppe, Cytochrom a₃ mit einer Häm a₃-Gruppe und zwei Kupferionen CuA und CuB (Maneg et al. 2003, Papa 2005). Die katalytischen Zentren des Komplexes werden jeweils von zwei prosthetischen Gruppen gebildet und befinden sich in den Untereinheiten I und II. Untereinheit I enthält das bimetallische Zentrum Cytochrom a CuA und Untereinheit II das bimetallische Zentrum Cytochrom a₃ CuB (Maneg et al. 2003). Der erste Schritt in der Cytochrom c-Oxidase-Reaktion ist der Transfer von einem Elektron von Cytochrom c zu dem Cytochrom a CuA-Zentrum, welches das Elektron weiterleitet zu dem zweiten katalytischen Zentrum Cytochrom a₃ CuA. Das Cytochrom a₃ CuA-Zentrum transferiert dann das Elektron auf den bereits gebundenen Sauerstoff, der dadurch teilreduziert wird und erst durch Aufnahme von drei weiteren Elektronen, stammend von Cytochrom c, sowie 4 Protonen vollständig reduziert wird (Maneg et al. 2003, Papa 2005).

1.3.5 ATP-Synthase (Komplex V)

Die ATP-Synthase, auch F₁F₀-ATPase genannt, konvertiert, angetrieben durch den Protonengradienten, die freiwerdende Energie der Elektronentransportkette in chemische Energie in Form von ATP (Capaldi et al. 2000, Böttcher 2000, Dimroth et al. 2006, Olgun 2007). Komplex V ist zusammengesetzt aus zwei Anteilen, dem löslichen, hydrophilen F₁-Teil und dem hydrophoben F₀-Teil. F₁ besteht aus fünf Untereinheiten und enthält die drei katalytischen Zentren des Enzyms. Der F₀-Teil, zuständig für die Protonentranslokation, besteht aus zehn Untereinheiten und ist in die innere Mitochondrienmembran eingebettet (Capaldi et al. 2000, Böttcher 2000, Dimroth et al. 2006). Der F₁- und F₀-Teil sind über eine Art „Stiel“ miteinander verbunden, der von vier der zehn Untereinheiten des F₀-Teils gebildet wird (Houstek et al. 1999, Dimroth et al. 2006).

Die ATP-Synthase ist hauptsächlich im Kern kodiert, lediglich zwei Untereinheiten des F_0 -Teils sind mitochondrialer Herkunft (Houstek et al. 1999). Bei der ATP-Synthese werden Protonen in den Intermembranspalt gepumpt. Die Protonenbewegung wird dann in eine rotatorische Drehbewegung des Stielanteils des F_0 -Teils umgesetzt. Diese Drehung übt eine Kraft aus, die zu den drei katalytischen Zentren des F_1 -Teils übertragen wird. Diese Kraft wird dann für die ATP-Synthese aus ADP und Phosphat genutzt.

Die Drehung des Stiels um 360° liefert in drei Schritten drei Moleküle ATP. Da der Stiel sich bei jedem Protonendurchgang um 120° dreht, wird für jedes ATP die Translokation von vier Protonen benötigt (Noji und Yoshida 2000, Boyer 2001, Dimroth et al. 2006, Olgun 2007).

1.4 Sauerstoffsensormodelle

Sauerstoff spielt eine zentrale Rolle für das Überleben von Säugetieren. Er dient der Zelle als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette, die auf diesem Wege Energie in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung gewinnen kann (Lopez-Barneo et al. 1997). Um auf eine Sauerstoffunterversorgung reagieren zu können, hat der Säugetierorganismus eine Vielzahl von adaptiven Mechanismen entwickelt.

Systemisch führt eine Hypoxie zu pulmonalen und kardiovaskulären Adaptionen, wie reflektorische Hyperventilation, Blutdruckanstieg (Chandel et al. 2000, Prabhakar 2006), Katecholaminausschüttung und hypoxische pulmonale Vasokonstriktion von nicht-ventilierten Lungenabschnitten (Chandel et al. 2000, Waypa et al. 2001).

Auf zellulärer Ebene führt ein Sauerstoffmangel zu einer transkriptionalen Aktivierung von Erythropoietin (z.B. in Leber und Niere), VEGF (vascular endothelial growth factor), Endothelin, glykolytischen Enzymen und speziellen Glucosetransportern (Srinivas et al. 1998, Chandel et al. 1998, 2000, Bell et al. 2005). Spezielle chemosensitive Zellen bilden ein sauerstoffsensitives Regulationssystem, das den Sauerstoffpartialdruck im Blut und in den Atemwegen kontinuierlich misst und bei einer niedrigen Sauerstoffkonzentration mit den bereits oben beschriebenen, zentral vermittelten, pulmonalen und kardiovaskulären Anpassungsmechanismen reagiert (Lopez-Barneo et al. 1997, Chandel et al. 2000).

Zu solch spezialisierten Zellen zählen die Typ I-Zellen des Glomus caroticum, die Neuroepithelkörperchen und glatten Muskelzellen der Lunge und die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Keating et al. 2005). Bei Hypoxie kommt es in diesen Zellen zu einer Hemmung von sauerstoffsensitiven K^+ -Kanälen und L-Typ Ca^{2+} -Kanälen mit daraus resultierender Membrandepolarisation.

Je nach Zelltyp kommt es dann zu einem Anstieg der Neurotransmittersekretion, oder zur Kontraktion von glatten Muskelzellen (Prabhakar 2006, Keating et al. 2005).

Eine bedeutende Rolle bei der zellulären Hypoxieantwort spielt dabei ein Proteinkomplex, der „hypoxia inducible factor“ (HIF), der ein Hauptregulator der sauerstoffabhängigen Genexpression ist (Lahiri et al. 2006). HIF ist ein Mitglied der bHLH (basic-Helix-loop-Helix) PAS-Familie (PER, ARNT, SIM = PAS) von Transkriptionsfaktoren und ist zusammengesetzt aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β oder ARNT (aryl-hydrocarbon nuclear translocator) (Sirinvas et al. 1998, Acker&Acker 2004, Bell et al. 2005). HIF-1 β wird kontinuierlich in der Zelle exprimiert und ist unabhängig vom Sauerstoffangebot (Bell et al. 2005). HIF-1 α wird dagegen auf molekularer Ebene über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Hydroxylierung sauerstoffabhängig reguliert (Acker&Acker 2004). Unter Normoxie wird HIF-1 α durch einen E3-Ubiquitin-Ligasekomplex abgebaut, der das von Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein (pVHL) als Cofaktor enthält, welches als Erkennungskomponente der E3-Ubiquitinligase fungiert (Yu et al. 2001). Die Ubiquitilierung bereitet dann HIF-1 α für einen proteosomalen Abbau vor. Die Bindung des E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes an die ODD-Domäne (oxygen-dependent degradation domain) des HIF-1 α (Huang et al. 1998) und der daraus resultierende proteosomale Abbau sind abhängig von einer vorausgegangenen Hydroxylierung von Prolinresten des HIF-1 α durch eine sauerstoffabhängige Prolylhydroxylase (Acker&Acker 2004, Bell et al. 2005). Die enzymatische Hydroxylierung ist sauerstoffabhängig, da das O₂-Atom der Hydroxylgruppe aus einer vorherigen Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat zu Succinat stammt, für die molekularer Sauerstoff benötigt wird. Cofaktor der Hydroxylierung der Prolinreste des HIF-1 α ist neben 2-Oxoglutarat auch Eisen (Bell et al. 2005).

Sauerstoff regelt auch die Interaktion des HIF-1 α mit seinen transkriptionalen Cofaktoren p300 und CBP (CREB binding protein). Unter Normoxie werden Asparaginreste des HIF-1 α durch das Enzym FIH-1 (factor inhibiting HIF) hydroxyliert, was die Bindung der Cofaktoren p300 und CBP verhindert (Arany et al. 1996, Bell et al. 2005, Acker&Acker 2004). Ohne diese Cofaktoren ist die Aktivierung der HIF-Zielgene nicht möglich.

Die Cofaktoren können nur binden, wenn HIF-1 α in einer stabilen Form vorliegt. Dies ist nur bei Hypoxie der Fall, da es auf Grund des Sauerstoffmangels zu keiner Hydroxylierung kommt.

Bei Hypoxie kommt es zum Aktivitätsverlust der Prolylhydroxylase und der Abbau des HIF-1 α kann nicht stattfinden. HIF-1 α kann nun in den Kern transportiert werden, wo auch die Cofaktoren p300 und CBP gebunden werden und dort als transkriptionaler Aktivator des Enhancers die Transkription seiner Zielgene einleiten (Acker&Acker 2004).

Neben den bereits beschriebenen Mediatoren der HIF-Regulation wird auch eine Beteiligung anderer Komponenten diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass Eisenchelatoren, wie z.B. Desferrioxamin (DFO), in der Lage waren, HIF-1 α zu stabilisieren und die HIF-1 α abhängigen Gene zu aktivieren. Da Eisen ein Cofaktor der Hydroxylierung des HIF-1 α ist, könnten Eisenchelatoren möglicherweise die Hydroxylierung unterdrücken und somit zur HIF-1 α Stabilisierung führen (Kroll et al. 1998, Bell et al. 2005). Des Weiteren wird eine mögliche Beteiligung der von Mitochondrien erzeugten ROS diskutiert. Die mitochondriale Atmungskette produziert während Hypoxie vermehrt ROS, die notwendig sind, um HIF-1 α zu stabilisieren und zu aktivieren (Acker&Acker 2004, Bell et al. 2005) und auch für die Bindung von HIF-1 an die spezifischen DNA-Abschnitte benötigt werden (Chandel et al. 1998).

Eine nicht-hypoxische HIF-1 α Stabilisierung mit Genaktivierung spielt eine Rolle bei der Tumorphathogenese, speziell bei der Tumorangiogenese. Eine Überexpression von HIF-1 α führt bei einer Reihe von malignen Tumoren zu einer schlechteren Prognose (Giaccia et al. 2004). Das pVHL als Teil des HIF-1 α abbauenden Multikomplexes ist das Produkt des VHL-Tumor-Suppressor-Gens. Das VHL-Syndrom (von Hippel-Lindau-Syndrom) ist eine dominant vererbte Erkrankung, die durch multiple hypervaskularisierte Tumore (Leber, Niere, Pankreas, Angiome der Netzhaut, zentrales Nervensystem) charakterisiert ist. Die Inaktivierung des VHL-Gens hat eine Hochregulierung von Angiogenesefaktoren wie VEGF zur Folge, was durch den durch Inaktivierung des Gens aufgetretenen Defekt in der Ubiquitilierung des HIF-1 α bedingt ist (Ivan et al. 2002, Astuti et al. 2001, 2004). In den betroffenen Zellen kommt es dann zu einer Pseudohypoxie mit überschießender Angiogenese, ausgelöst durch die ungehemmte Produktion und Stabilisierung von HIF-1 α (Pollard et al. 2003). Die Überexpression von HIF im Tumor findet hypoxieabhängig in nekrotischen Tumoranteilen und hypoxieunabhängig bei der Aktivierung von Onkogenen und Wachstumsfaktoren statt. HIF-Aktivierung ruft eine koordinierte Zusammenarbeit zwischen Tumor, Endothel, inflammatorischen hämatopoetischen Prozessen und zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen auf molekularer und zellulärer Ebene hervor. Somit ist HIF auch ein wichtiger Mediator des Tumorwachstums (Blancher et al. 2000, Acker&Acker 2004).

Obwohl die Erkenntnisse über die zellulären Mechanismen der Sauerstoffmessung immer zahlreicher werden, bleiben viele Signalwege unklar. Das weite Feld der verschiedenen pO_2 Verteilungen innerhalb der verschiedenen Gewebe führt möglicherweise dazu, dass verschiedene Sauerstoffsensormechanismen in den einzelnen Geweben und Zellen genutzt werden. Dies sollte berücksichtigt werden, um allzu schnelle Verallgemeinerung zu verhindern. Aktuell stehen verschiedene Sauerstoffsensormodelle zu Diskussion, von denen die wichtigsten nachfolgend kurz aufgeführt werden.

1.4.1 Die Prolylhydroxylase als Sauerstoffsensor

Prolylhydroxylasen (PHD) spielen eine wichtige Rolle bei der Hypoxieantwort der Zelle. Bei Normoxie regulieren sie HIF über Hydroxylierung von Prolinresten der 1α Untereinheit, die dadurch für den weiteren Abbau „markiert“ wird. In der menschlichen Zelle sind drei sauerstoffabhängige Prolylhydroxylasen bekannt, PHD 1-3. PHD1 kommt nur im Kern vor, PHD2 nur im Zytoplasma und PHD3 sowohl im Kern also auch im Zytoplasma (Metzen et al. 2003, Acker&Acker 2004). Diese HIF-Prolylhydroxylasen benötigen als Cofaktoren Sauerstoff, Eisen und 2-Oxoglutarat (Wenger et al. 2000, Acker&Acker 2004, Bell et al. 2005) sowie Ascorbat, um eine Selbstoxidation zu verhindern (Ivan et al. 2002). 2-Oxoglutarat wird in einer vorangegangenen Reaktion zu Succinat decarboxyliert, wofür molekularer Sauerstoff benötigt wird. Des Weiteren stammt das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe ebenfalls von molekularem Sauerstoff (Bell et al. 2005). Eine Inhibierung dieser Hydroxylasen durch spezielle Inhibitoren oder durch Hypoxie, führt zu einer Anreicherung von HIF- 1α . Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zelle ist somit essenziell für das Reaktionsvermögen der HIF-Prolylhydroxylase und dem damit verbundenen Abbau des HIF- 1α . Auf Grund dieser Sauerstoffabhängigkeit könnten die Hydroxylasen als primärer Sauerstoffsensor fungieren (Acker&Acker 2004, Bell et al. 2005).

1.4.2 Ein Hämprotein als Sauerstoffsensoren

Eisenchelatoren wie DFO sind in der Lage HIF-1 α zu stabilisieren und HIF-1 α -abhängige Gene zu aktivieren. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass ein Häm-Protein mit schnellem turn-over, welches mit Sauerstoff interagiert, ein Sauerstoffsensoren sein könnte (Bell et al. 2005). Hypoxie wird dann durch einen Shift an der Häm-Seite eines Proteins vermittelt, dessen Konformation sich auf Grund des Sauerstoffmangels von „oxy“ zu deoxy“ ändert, was dann den intrazellulären Signalweg der Hypoxieantwort der Zelle aktiviert (Bunn et al. 1998, Chandel et al. 2000). Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass eine Inkubation bestimmter Hepatozytenzelllinien (Hep 3P oder Hep G2) mit Kobaltchlorid zu einem Anstieg der Erythropoietin-mRNA Konzentration unter Normoxie führte. Ebenso konnte durch Injektion von Kobaltchlorid eine erhöhte Erythropoietinsekretion und eine Polzytämie bei Ratten ausgelöst werden (Chandel et al. 2000). Man ging davon aus, dass das Kobalt anstelle von Eisen in das Häm-Protein eingebaut wird und dadurch die Konformation zu deoxy geändert wird, was als ein Beweis für die Beteiligung eines Häm-Proteins angesehen wurde (Kroll et al. 1998, Bunn et al. 1998). Srinivas et al. (1998) konnten jedoch zeigen, dass es trotz eines Inhibitors der Hämsynthese zu einer Hypoxieantwort der Zelle kam.

Auf Grund der hyperbolischen Sauerstoffstimulationskurve im Glomus caroticum, die der spiegelbildlichen Hämoglobindissoziationskurve ähnelt, geht man dennoch davon aus, dass ein Hämoglobin-verbundenes Molekül oder ein Häm-enthaltendes Protein als Sauerstoffsensoren fungiert bzw. an der Sauerstoffmessung beteiligt ist (Lahiri et al. 1999, Prabhakar 2006). Als mögliche Sensoren werden die Häm-enthaltenden Cytochromoxidasen der mitochondrialen Atmungskette postuliert, da Inhibitoren der Atmungskette die sensorische Nervenaktivität im Glomus steigern konnten, ähnlich wie bei Hypoxie. Speziell das Cytochrom a3 (Prabhakar 2006), das Cytochrom b558 (Kroll et al. 1998) und das Cytochrom a592 (welches nur im Glomus vorkommt) (Acker&Acker 2004) werden wegen ihrer niedrigen Affinität zu Sauerstoff als Sensoren vorgeschlagen. Auch nicht-mitochondriale Enzyme, die Häm enthalten und molekularen Sauerstoff für ihre enzymatische Aktivität benötigen, werden als Sauerstoffsensoren vorgeschlagen. Hierzu zählen die Nitritoxidsynthasen (NOS), die Hämoxygenasen (HO) 1 und 2 und die NADPH-Oxidasen. Studien konnten zeigen, dass eine Inhibition von NOS und HO2 die sensorische Aktivität des Glomus caroticum erhöht (Prabhakar 2006).

Ein kürzlich vorgeschlagenes Modell sieht nicht die Häm-entaltenden Proteine als alleinige Sauerstoffsensoren, sondern geht davon aus, dass eine Gesamtheit von verschiedenen Häm-enthaltenden Proteinen mit sauerstoffsensitiven K^+ -Kanälen interagieren und als „Chemosomen“ den Sauerstoff messen (Bell et al. 2005, Prabhakar 2006).

1.4.3 Ionenkanäle als Sauerstoffsensoren

Studien an Ratten, Mäusen und Kaninchen konnten zeigen, dass Hypoxie den Kaliumflux durch die Plasmamembran hemmt. In Typ-I Zellen des Glomus caroticum verursacht Hypoxie eine Inhibition von K^+ -Kanälen mit anschließendem Kalziumeinstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Dieser Einstrom führt dann zur Transmitterausschüttung und Aktivierung von afferenten Nervenendigungen (Giacci et al. 2004).

Innerhalb der verschiedenen Spezies findet man unterschiedliche Typen von sauerstoffsensitiven K^+ -Kanälen. In Glomuszellen von Kaninchen inhibiert Hypoxie einen einfachen K^+ -Kanal, in Glomuszellen der Ratten dagegen einen Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal. Eine Blockade der kalziumabhängigen K^+ -Ströme unter Normoxie konnte den Effekt der Hypoxie auf Glomuszellen nachahmen. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in einem intakten Glomus caroticum beobachtet werden (Prabhakar 2006), da es vermutlich mehrere Mechanismen der sauerstoffregulierten Kanalöffnung gibt (Lopez-Barneo et al. 1997, Chandel et al. 2000, Keating et al. 2005). Neben K^+ -Kanälen zeigten auch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in glatter Gefäßmuskulatur, in den Chemorezeptorzellen des Glomus caroticum und in menschlichen embryonalen Nierenzellen eine Sauerstoffsensitivität. Die Entdeckung, dass sauerstoffsensitive L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch Oxidations- und Reduktionsmittel beeinflussbar sind, unterstützt die Annahme, dass ein zusätzlicher kanalunabhängiger Sauerstoffsensor in die Reaktion der Kanäle involviert sein könnte (Fearon et al. 2000). Lopez-Barneo et al. (2004) machten die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen und die verschiedenen Zelltypen, die für die Versuche genutzt wurden, verantwortlich für die unterschiedlichen gemessenen Sauerstoffsensitivitäten der einzelnen K^+ -und Ca^{2+} -Kanälen. Sie vertreten die Annahme, dass Ionenkanäle für die Sauerstoffmessung nicht wesentlich sind, aber erforderlich für Interaktionen von sauerstoffsensitiven Signalmolekülen und den Untereinheiten der Kanäle. Weitere Experimente zeigten eine Beteiligung von membranassoziierten Prozessen bei der Sauerstoffmessung von Ionenkanälen (Perez-Garcia et al. 1999).

Basierend auf der von Perez-Garcia genutzten Patch-clamp-Methode zur Gewinnung von einzelnen Membranabschnitten konnte Rustenbeck et al. (1999) zeigen, dass bei dieser Probengewinnung Mitochondrien am gewonnenen Membranabschnitt haften bleiben können. Dies führte zu der Vermutung, dass Mitochondrien am Sauerstoffsensormechanismus beteiligt sind und mit den Ionenkanälen eine funktionelle Einheit bilden. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Erkenntnis, dass mitochondriale Hemmstoffe die Öffnungswahrscheinlichkeit von ATP-abhängigen K^+ -Kanälen beeinflussen können (Rustenbeck et al. 1999). Studien mit Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette konnten jedoch beweisen, dass eine Blockade des Elektronenflusses in der ETC keinen Effekt auf Hypoxieantwort der K^+ -Kanäle im Glomus hat (Giaccia et al. 2004).

Obwohl eine Reihe von verschiedenen sauerstoffsensitive Ionenkanälen bekannt ist, gilt das Hauptinteresse den sauerstoffsensitiven K^+ -Kanälen. Involviert in die akute Sauerstoffmessung sind sehr wahrscheinlich: der spannungsabhängige K^+ -Kanal der Shaker-Familie (K_v), der ATP-sensitive K^+ -Kanal (K_{ATP}), der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal (K_{Ca}) und ein Hintergrund- K^+ -Kanal ähnlich dem säuresensitiven, 2-Porendomänen K^+ -Kanal (TASK 1-3), bestehend aus vier transmembranen Segmenten und zwei Poren-Domänen, der das Ruhepotenzial der Zelle reguliert (Buckler et al. 2000, Lopez-Barneo et al. 2004).

Spannungsabhängige K^+ -Kanäle spielen u.a. eine Rolle bei der hypoxieinduzierten pulmonalen Vasokonstriktion und ATP-sensitive K^+ -Kanäle sowie Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle bei der hypoxievermittelten Vasodilatation in den Koronarien und Gefäßen im Gehirn (Lopez-Barneo 2004). TASK ähnliche K^+ -Kanäle konnten in Typ-I Zellen (Johnson et al. 2003) und Typ-II Zellen (Kummer et al. 2002) des Glomus caroticum der Ratte identifiziert werden.

1.4.4 Chemosomen als Sauerstoffsensoren

Bei diesem Modell, postuliert für die Sauerstoffmessung im Glomus caroticum, geht man davon aus, dass Interaktionen zwischen Häm-enthaltenden Proteinen und sauerstoffsensitiven K^+ -Kanälen, die dann als „Chemosomen“ agieren, für die Sauerstoffmessung verantwortlich sind (Prabhakar 2006). Das Glomus caroticum reagiert in Sekundenbruchteilen auf die kleinsten Schwankungen im Sauerstoffpartialdruck (~ 20 -80 mmHg). Die Antwort der Ionenkanäle auf Hypoxie findet in weniger als einer Sekunde statt und könnte die extrem schnelle Antwort des Glomus auf Sauerstoffmangel erklären.

Auf Grund ihrer unterschiedliche Sauerstoffaffinitäten könnten verschiedene Häm-enhaltende Proteine jeweils als Sauerstoffsensoren agieren, und so dem Glomus ermöglichen, innerhalb einer breiten Spanne von Sauerstoffpartialdrücken zu reagieren. Geht man davon aus, dass diese beiden Systeme zusammenarbeiten, könnte das die schnelle und präzise Reaktion des Glomus caroticum auf Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks erklären (Prabhakar 2006). Obwohl diese Theorie bisher nur für die Sauerstoffmessung im Glomus caroticum aufgestellt wurde, ist es dennoch möglich, dass andere Zellen in einer ähnlichen Form den Sauerstoffpartialdruck messen und nach einem zellspezifischen Muster die Hypoxieantwort einleiten.

1.4.5 Die NADPH-Oxidase als Sauerstoffsensor

Phagozyten enthalten eine membrangebundene NADPH-Oxidase, die Sauerstoff zu $O_2^{\cdot-}$ reduziert, der dann nach Umwandlung durch eine Dismutase als H_2O_2 zur Abwehr von pathogenen Bakterien und Pilze dient (Acker 1994). Die NADPH-Oxidase besteht aus einem membrangebundenen katalytischen Komplex, bestehend aus zwei Proteinkomponenten, gp91phox und p22phox, die zusammen das Flavocytochrom b558 bilden, und den zytosolischen Regulationsfaktoren p47phox, p67phox, p40phox sowie Rac1 oder Rac2 (Bánfi et al. 2004).

Die NADPH-Oxidase ist ein ROS-Produzent in vielen Zellsystemen und benötigt für ihre katalytische Aktivität molekularen Sauerstoff, weshalb sie möglicherweise als Sauerstoffsensor fungieren könnte (Prabhakar 2006). Auf Grund ihrer niedrigen K_m (K_m ist die Michaeliskonstante, die als Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat gilt. Je kleiner der K_m Wert eines Enzyms ist, desto größer ist seine katalytische Effizienz.) könnte sie ebenfalls als Sauerstoffsensor tätig sein, speziell für niedrige und mittlere Sauerstoffpartialdrücke (Görlach et al. 2003). In früheren Studien konnte photometrisch ein Cytochrom b ähnliches Flavohämprotein in sauerstoffsensitiven Zellen (Neuroepithelkörperchen in der Lunge, Typ I Zellen des Glomus caroticum und Gefäßmuskelzellen in der Lunge) nachgewiesen werden, welches zudem noch immunhistochemisch mit speziellen Antikörpern gegen Untereinheiten der NADPH-Oxidase reagierte (Wang et al. 1996, Youngson et al. 1997). Man vermutet, dass dieses Cytochrom b558 einer NADPH-Oxidase sauerstoffabhängig ROS produziert und dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit von K^+ -Kanälen und die Expression bestimmter Gene beeinflusst

(Fu et al. 2000). Bei Normoxie überträgt die NADPH-Oxidase Elektronen auf Sauerstoff, wodurch Superoxid entsteht.

Diese rasche Generierung der ROS führt zu einem oxidierten Redoxstatus im Zytosol, was ein regulatorisches Protein der Hypoxieantwort beeinflusst (Chandel et al. 2000, Acker&Acker 2004). Bei Hypoxie kommt es dann zu einem Abfall in der ROS-Produktionsrate, was zu einem Shift des zytosolischen Redoxstatus in einen reduzierten Zustand führt. Durch die sauerstoffabhängige Bildung von ROS, die dann als second messenger für die Interaktionen von K^+ -Kanäle fungieren, könnte ein solches System die unterschiedliche Durchlässigkeit der sauerstoffsensitiven K^+ -Kanäle erklären, unabhängig von einem direkten Effekt von Sauerstoff auf die Kanäle (Chandel et al. 2000). Das aus einem von der NADPH-Oxidase produzierte Superoxidion entstandene H_2O_2 , oxidiert in einem anderen Modell direkt einen Ionenkanal und ändert damit dessen Öffnungswahrscheinlichkeit (Peers et al. 2001, Lopez-Barneo et al. 2004). Für eine Beteiligung der NADPH-Oxidase bei der Hypoxie-induzierten Öffnung von Ionenkanälen spricht auch die Beobachtung, dass in Neuroepithelkörperchen von Oxidase-defizienten Mäusen das Reaktionsvermögen von sauerstoffsensitiven K^+ -Kanälen auf Hypoxie erniedrigt ist (Fu et al. 2000). Trotzdem zeigen diese Mäuse noch eine hypoxische pulmonale Vasokonstriktion und eine unveränderte Funktion des Glomus, was für ein multiples Sauerstoffsensorsystem mit Beteiligung der NADPH-Oxidase innerhalb einer Zelle spricht (Acker&Acker 2004, Keating et al. 2005).

Ergebnisse einiger Studien sprechen jedoch gegen eine Funktion der NADPH-Oxidase als Sauerstoffsensor. So zeigen Mäuse mit einer defekten NADPH-Oxidasefunktion keine Veränderungen in der Hypoxieantwort des Glomus caroticum und der glatten Gefäßmuskulatur der Lungengefäße (Lopez-Barneo et al. 2004). Ein von Kroll et al. (1998) eingesetzter Inhibitor der NADPH-Oxidase hatte keinen Effekt auf die H_2O_2 Konzentration, weder bei Normoxie noch bei Hypoxie. Patienten mit chronischer Granulomatose, deren Erkrankung aus einem Defekt einer oder mehrerer NADPH-Oxidase-Untereinheiten resultiert, haben normale Erythropoietinkonzentrationen und können auf Hypoxie reagieren (Chandel et al. 2000). Ebenso produzieren Zelllinien von Granulomatosepatienten trotz einer defekten NADPH-Oxidaseaktivität unter Hypoxie VEGF (Chandel et al. 2000).

1.4.6 Mitochondrien als Sauerstoffsensor

Mitochondrien sind für den Verbrauch eines Großteils des Sauerstoffs in der Zelle verantwortlich, weshalb sie als potenzielle Sauerstoffsensoren in Frage kommen. Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette induzieren in chromaffinen Zellen der Nebenniere und in Glomuszellen der Ratte einen Calciumeinstrom mit nachfolgender Katecholamin-ausschüttung, wie es auch unter Hypoxie der Fall ist (Keating et al. 2005).

Die Entdeckung, dass die ROS-Produktion der Mitochondrien unter Hypoxie ansteigt, festigte die Annahme, dass Mitochondrien als Sauerstoffsensor in der Zelle fungieren könnten (Hoppeler et al. 2003, Giaccia et al. 2004, Bell et al. 2005). Der von den Mitochondrien genutzte Sauerstoff dient hauptsächlich der Energiegewinnung durch Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser. 2-3% des von den Mitochondrien genutzten Sauerstoffs werden allerdings nicht komplett reduziert und es kommt zur Bildung von ROS (Archer et al. 2002, Hoppeler et al. 2003, Lopez-Barneo et al. 2004). ROS wird benötigt für die Stabilisierung und die DNA-Bindung von HIF-1 α und die damit verbundene Genexpression von hypoxiespezifischen Genen (Chandel et al. 1998, Hoppeler et al. 2003, Bell et al. 2005). So können Inhibitoren der Atmungskette eine hypoxische Stabilisierung von HIF-1 α verhindern, und auch in p_0 Zellen (Mangel an Komplex I, III und IV) kommt es zu keiner Stabilisierung von HIF-1 α . Auch Antioxidanzien verhindern eine HIF-Stabilisierung bei Hypoxie (Bell et al. 2005).

ROS spielt dabei eine Rolle als second messenger, der über einen Signalweg die Hydroxylierung des HIF-1 α verhindert und dessen Aktivierung einleitet (Waypa et al. 2001, Hoppeler et al. 2003, Paddenberg et al. 2003).

Drei Signalmoleküle werden mit ROS und der HIF 1 α -Stabilisierung in Verbindung gebracht: eine GTPase wie rac oder RHO, eine c-Src-Kinase und p38 α MAPK. Einige Studien zeigten eine Aktivierung dieser Signalmoleküle bei Hypoxie und Oxidationsmitteln und eine Verhinderung ihrer Stabilisierung bei Anwesenheit von Antioxidanzien und Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette. Wie genau ROS diese Signalmoleküle aktiviert, ist nicht bekannt. Es wird ein Mechanismus vermutet, bei dem aus ROS generiertes H₂O₂ ins Zytosol gelangt und dort die c-Src-Kinase aktiviert, die wiederum rac aktiviert. Rac stimuliert dann p-38- α MAPK, welches daraufhin die Hydroxylierung von HIF-1 α verhindert. Der genaue Mechanismus mit dem p38- α -MAPK die Hydroxylierung verhindert, ist noch nicht geklärt, man vermutet aber eine mögliche Phosphorylierung und damit eine Inaktivierung der Prolylhydroxylase (Bell et al. 2005).

Eine andere Hypothese geht davon aus, dass Mitochondrien das intrazelluläre Redoxniveau regulieren und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kv-Kanälen beeinflussen. Basierend auf dieser Hypothese werden für das Entstehen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion zwei verschiedenen Modelle postuliert. Beim ersten Modell geht man davon aus, dass Hypoxie den mitochondrialen Elektronentransport erniedrigt und es zu einer Abnahme der ROS-Produktion von Komplex I und III und zu einem Anstieg des zytosolischen NADH kommt.

Der Abfall der NADH-Verwertung durch die Mitochondrien führt zu einem Shift des zytosolischen Redoxstatus in einen reduzierten Zustand. Dies wiederum beeinflusst redox-sensitive Thiolgruppen in einer regulatorischen Untereinheit eines spannungsabhängigen K^+ -Kanal, der sich daraufhin schließt. Die Abnahme im K^+ -Strom triggert eine Membrandepolarisation, die spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle öffnet, was zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom mit anschließender Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur führt. Das andere Modell sieht jedoch eine durch Hypoxie ausgelöste Erhöhung der ROS-Produktion als Ursache für den Shift des Redoxstatus der Zelle und den dadurch ausgelösten Ca^{2+} -Einstrom mit anschließender Muskelkontraktion (Waypa et al. 2005).

Der Komplex III gilt als Hauptquelle der ROS-Produktion bei Hypoxie (McLennan et al. 1999, Leach et al. 2001, Hoppeler et al. 2003, Chen et al. 2003, Giaccia et al. 2004, Acker&Acker 2004). Komplex III generiert ROS durch Übertragung von einzelnen Elektronen über Ubisemiquinon und Cytochrom c auf O_2 (Leach et al. 2001). Da der Sauerstoff dabei nicht vollständig reduziert wird, entstehen Superoxidradikale, die wegen ihrer Instabilität sehr schnell von einer Superoxid-Dismutase in H_2O_2 umgewandelt werden (Archer et al. 2002). Durch einen Wechsel im Redoxzustand, bedingt durch einen O_2 -Mangel, kommt es zu einer Abnahme der Geschwindigkeit des Elektronentransfers von Cytochrom c zu Komplex IV. Dies führt zur Ansammlung von reduzierten Zwischenprodukten der Atmungskette und so zur Produktion von ROS (Chandel et al. 1998, Leach et al. 2001, Lopez-Barneo et al. 2004). Inhibiert man Cytochrom c mit spezifischen Inhibitoren, findet keine HIF-1 α -Stabilisierung bei Hypoxie statt (Bell et al. 2005).

Ebenso gilt auch der Komplex I als ROS-Quelle. Elektronen treten dabei an dem FMN-Molekül des Komplexes aus und werden auf O_2 übertragen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt (Waypa et al. 2005). Eine Inhibition des Komplex I verhindert die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in Lungengefäßen (Leach et al. 2001) und die ROS-Produktion in Zellen (Leach et al. 2001, Paddenberg et al. 2003).

In Studien an chromaffinen Zellen der Nebenniere des Schafs konnte gezeigt werden, dass ein Wechsel des Redoxstatus bei Hypoxie stattfindet, der die Durchlässigkeit von SK-Kanälen beeinflusst, und dass dieser Sauerstoffsensormechanismus an einen Rotenon-sensitiven Signalweg gebunden ist. Da Rotenon ein starker Inhibitor des Komplex I der Atmungskette ist, lässt sich eine Beteiligung an der Sauerstoffmessung nicht ausschließen (Keating et al. 2005). Auch in Glomuszellen zeigte Rotenon einen Effekt auf die Hypoxieantwort.

Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht mit anderen Inhibitoren des Komplex I nachahmen (Lopez-Barneo et al. 2004).

Neben Komplex I und III steht auch Komplex II als ROS-Produzent zur Diskussion. So könnte ein umgekehrter Elektronentransfer von Komplex II zu Komplex I zu der ROS-Generierung beitragen (McLennan et al. 2001, Horsefield et al. 2004, Zmijewski et al. 2005). Das an Komplex II gebundene Semiquinon ($Qs^{\cdot-}$) ist sehr stabil und auf Grund seines hohen Redoxpotenzials leicht reduzierbar, z.B. durch NADH, und könnte deshalb einer der Hauptkomponenten der ROS-Produktion sein (McLennan et al. 2001). Inhibitoren der distalen Seite der Atmungskette wie Cyanid oder Antimycin A können die ROS-Produktion und die dadurch ausgelöste hypoxische pulmonale Vasokonstriktion nicht unterdrücken, woraus man schließen kann, dass die ROS-Produktion hauptsächlich an den proximalen Abschnitten der Atmungskette stattfindet (Waypa et al. 2005). Paddenberg et al. (2003) vermuten eine unterschiedliche Beteiligung der einzelnen Komplexe bei der ROS-Generierung unter Normoxie und Hypoxie. Bei Normoxie findet die ROS-Produktion hauptsächlich an Komplex I und III statt, bei Hypoxie wird zusätzlich der Komplex II benötigt. Inhibitoren der umgekehrten Enzymreaktion der SDH als Fumaratreduktase senken die ROS-Produktion bei Hypoxie, nicht aber bei Normoxie. Auf Grund dieser Beobachtung wäre es möglich, dass die katalytische Aktivität von SDH bei Hypoxie wechselt und sie dann als Fumaratreduktase die Richtung des Elektronenflusses zu Komplex I oder III moduliert (Paddenberg et al. 2003). Die Aktivität des Komplexes II nimmt unter Hypoxie zu, die der SDH dagegen nimmt ab. Succinatzugabe bei Hypoxie führt zu einem Abfall der ROS-Produktion, was dadurch erklärt werden kann, dass der als Fumaratreduktase agierende Komplex II durch Substratüberschuss gehemmt wird (Paddenberg et al. 2003). Der SDH-Inhibitor Malonat dagegen zeigt keinen Effekt auf die ROS-Produktion (McLennan et al. 2001). Um als Fumaratreduktase agieren zu können, benötigt der Komplex II Elektronen, die wahrscheinlich primär von NADH geliefert werden (Paddenberg et al. 2003).

Carboxin, ein Komplex II-Inhibitor, vermindert nur die ROS-Produktion, wenn er mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon kombiniert wird, was für eine Zusammenarbeit der Komplexe spricht (McLennan et al. 2001). Auch die Blockierung des Komplex III führt zu einem Abfall der ROS-Generierung. Komplex II überträgt möglicherweise nicht alle Elektronen auf Fumarat, sondern auch über die Eisen-Schwefel-Cluster und das Cytochrom c1 des Komplex III auf Komplex IV. Diese Reaktion läuft möglicherweise parallel zur Fumaratreduktion ab (Paddenberg et al. 2003).

2. Material und Methoden

2.1 Gewebegewinnung

2.1.1 Tiere

Die für die Versuche verwendeten Tiere waren Wistar Ratten (n = 10) beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 250-350 g und stammten aus der Zucht des Tierstalls des Physiologischen Instituts des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen. Für die Austestung im Rahmen der Immunisierung wurden 6 Wochen alte FVB-Mäuse (n = 5) aus der Zucht des Tierstalls des Physiologischen Instituts des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen verwendet.

2.1.2 Gewinnung von unfixiertem Gewebe

Die Tiere wurden durch Inhalation von Forene (Isoflorane, Abbott, Wiesbaden) getötet. Nach Eröffnung des Brustkorbs mittels Durchtrennung der seitlichen Rippen wurden der Kehlkopf und die Trachea freipräpariert und die Trachea unterhalb des Kehlkopfes abgetrennt. Die gesamten thorakalen Eingeweide (Herz, Thymus, Lunge, Trachea, Ösophagus, Gefäße und Nerven) wurden daraufhin weiter freipräpariert und entnommen. In die Trachea wurde über einen kleinen Einschnitt eine Venenverweilkanüle (2,2 mm Durchmesser; Braun, Melsungen) eingeführt. Über diese Kanüle wurde die Lunge mit Tissue Tec (Sakura, Zoeterwoude, Holland) und 0,1 M PP (Phosphatpuffer, pH 7,4) im Verhältnis 1:1 gebläht. Anschließend wurden die thorakalen Eingeweide in Tissue Tec eingebettet und in Isopentan, gekühlt in flüssigem Stickstoff, schockgefroren. Bis zu seiner Verwendung wurde das Gewebe dann bei -20°C gelagert. Das für die SDH-Histochemie verwendete Gewebe wurde bis zu seiner Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.3 Gewinnung von fixiertem Gewebe

Die Tiere wurden durch Inhalation von Forene (Isoflorane) getötet und der Brustkorb durch das Durchtrennen der seitlichen Rippen eröffnet. Danach wurde in die linke Herzkammer eine Knopfkanüle (2,2 mm Durchmesser; Braun, Melsungen) eingeführt und das rechte Herzohr abgetrennt, damit das Blut herauslaufen konnte. Das Tier wurde dann über die Knopfkanüle mit Vorspüllösung perfundiert, um das Blut heraus zu waschen. Anschließend wurde dann das Tier wiederum über die Knopfkanüle mit dem Fixierungsmittel PFA 4% (4% Paraformaldehyd in 0,1 M PP, pH 7,2-7,4) oder Zamboni-Fixativ (siehe Lösungen und Puffer) perfundiert. Dem Fixieren folgte dann eine einstündige Lagerung im Kühlschrank bei 4°C. Danach wurden die thorakalen Eingeweide (Herz, Thymus, Lunge, Trachea, Ösophagus, Gefäße und Nerven) herauspräpariert und für 1-2 Stunden in die Fixationslösung (PFA 4% oder Zamboni Fixativ) gelegt. Die thorakalen Eingeweide wurden mit 0,1 M PP ein bis zwei Tage gespült, bis die überschüssige Fixationslösung ausgewaschen war, und dann über Nacht in 18% Saccharose in 0,1 M PP gelegt. Dann wurde das fixierte Gewebe in Tissue Tec eingebettet und in Isopentan, gekühlt in flüssigem Stickstoff, schockgefroren. Bis zu seiner Verwendung wurde das Gewebe dann bei -20°C gelagert.

2.1.4 Herstellung von Gewebeschnitten

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurde das zu untersuchende, bereits schockgefrorene Gewebe von Maus oder Ratte mittels eines Kryostaten (CM 1900, Leica, Bensheim) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und diese auf Objekträger SuperFrost Plus (R. Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen. Das native Gewebe wurde für 15 min in kaltem PFA 4% fixiert. Dem Fixieren folgte ein Waschschrift in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4) (2 x 10 min) und destilliertem Wasser (1x 10 min). Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2 Antikörpergewinnung

2.2.1 Datenbankrecherchen

Die für die Immunisierung benötigten Peptidsequenzen wurden aus verschiedenen Datenbanken ausgewählt und gegen Sequenzen von Ratte und Maus verglichen, um Homologien aufzudecken. Dafür wurde für die Untereinheit A der SDH aus der Maus die Sequenz über <http://www.Informatics.jax.org> aufgesucht und mit Hilfe des Programms *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/>) im Modus „*protein query translated database*“ mit Sequenzen von Maus und Ratte verglichen. Die Sequenzen der Untereinheiten SDHB, SDHC und SDHD stammten aus der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und wurden ebenfalls mittels des Programms „*Blast*“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/>) mit Sequenzen von Maus und Ratte verglichen. Die Sequenz mit der größten Homologie (SDHA accession number Q921P5 aus <http://www.informatics.jax.org/>, SDHB accession number NP_075863 ab Aminosäure 55, SDHC accession number Q9CZB0 und SDHD XP_134803 aus der NCBI Datenbank) wurde ausgewählt und an die Firma Pineda (Pineda-Antikörperservice, Berlin) gesendet, um dort eine Epitopenanalyse anfertigen zu lassen. Diese Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen basiert auf der Methode von Parker et al. (1986) und den Algorithmen von Janin (1979) und Karplus et al. (1985). Dabei wird mit Hilfe der Algorithmen ein Oberflächenprofil des Proteins erstellt. Für die Antikörpergewinnung aus dem Peptid werden die jeweiligen Aminosäuresequenzen ausgesucht, die oberhalb von 50% über dem Mittelwert der jeweiligen Skala für das gesuchte Protein liegen. Diese können dann für eine Immunisierung genutzt werden. Basierend auf den Ergebnissen der Epitopenanalyse wurden folgende Sequenzen ausgewählt:

- SDHA: NH2-CARKESRGAHAREDYK-CONH2
- SDHB: NH2-CEPYLKKKDESQEGKQ-CONH2
- SDHC: NH2-TTAKEEMERFWKKC- CONH2
- SDHD: NH2-CSPHHSKKAASLHW- CONH2

2.2.2 Antikörperherstellung

Für die Herstellung der Antiseren wurden jeweils 2 Kaninchen und ein Meerschweinchen mit der ausgewählten Sequenz (siehe oben) immunisiert. Beauftragt wurde damit die Firma Pineda (Pineda-Antikörperservice, Berlin). Die Immunisierung der Tiere erfolgte über einen Zeitraum von 130 Tagen durch Injektion des Peptids alle 14 Tage. Die Austestung der Antiseren erfolgte alle 30 Tage in verschiedenen Verdünnungsreihen. Ausgetestet wurde nach einem Protokoll, welches für die Inkubation der monoklonalen Antikörper gegen SDHA und SDHB entwickelt wurde: Formaldehydfixiertes Gewebe wurde in 50 mM Tris Puffer (pH 8,0) 30 Minuten in einem Wasserbad gekocht und anschließend bei Raumtemperatur 15 Minuten abgekühlt. Danach folgte ein Waschschriff von 10 Minuten in PBS (siehe Lösungen und Puffer) plus 0,1% Triton X-100 und zwei weitere Waschschriffe von jeweils 5 Minuten in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung + NaCl). Dem Waschen folgte das Blocken unspezifischer Bindungen mit „Histoblocklösung“ (siehe Lösungen und Puffer) für 30 Minuten und die Inkubation mit dem Antiserum.

Ausgetestet wurde jeweils mit den Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200. Die erste Reaktion zeigte sich bereits nach den ersten 30 Tagen bei dem Antikörper gegen SDHA des Kaninchen 1. Die anderen Tiere zeigten noch keinerlei Reaktion, auch nicht bei den Antikörpern gegen die anderen Untereinheiten. Nach 60 Tagen zeigten sich dann auch leichte Markierungen der anderen Untereinheiten, allerdings nur bei sehr niedrigen Verdünnungen (1:200 und 1:400). Am 90. Tag zeigten alle Antikörper bereits gute Markierungen in allen Verdünnungen. Auf Grund guter Markierungsergebnisse wurde das jeweilige Kaninchen 2 daraufhin getötet. Die letzte Austestung erfolgte dann am 120. Immunisierungstag und zeigte bei allen 4 verbliebenen Antiseren gute Ergebnisse. Daraufhin wurden die restlichen immunisierten Tiere getötet. Jeweils ein Teil der gewonnenen Antiseren wurde von Pineda affinitätsgereinigt.

2.3. Immunhistochemische Verfahren

2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

2.3.1.1 Entwicklung der Inkubationsmethode

Das, wie oben beschrieben, gewonnene und affinitätsgereinigte Serum wurde an verschiedenen Geweben getestet, mit verschiedenen Verdünnungen inkubiert und mit verschiedenen Fixierungen fixiert, um ein optimales Ergebnis der Markierung zu erzielen. Um die optimale Verdünnung zu finden, wurden die Antikörper in den Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 und 1:3200 ausgetestet. Die optimalen Verdünnungen, mit denen dann gearbeitet wurde, sind in Tabelle 2 (Seite 35) aufgeführt. Um die optimale Fixierung zu finden, wurde das für die Inkubation benutzte Gewebe nativ geschnitten mit verschiedenen Fixationsmitteln fixiert. Verwendet wurde PFA 4%, Aceton, Isopropanol und Zamboni-Fixativ. Die Gewebe wurden wie folgt mit den einzelnen Fixierungsmitteln fixiert:

- 10 Minuten in -20°C kaltem Aceton
- 10 Minuten in 4°C kaltem Isopropanol
- 10 Minuten in 4% PFA
- Zamboni-Fixativ: direkte Fixierung nach Tiertötung, siehe 1.3 (Gewinnung von fixiertem Gewebe)
- 4% PFA: direkte Fixierung nach Tiertötung, siehe 1.3 (Gewinnung von fixiertem Gewebe)

Das beste Ergebnis zeigte Gewebe, welches nativ geschnitten und nach dem Schneiden für 10 Minuten in PFA 4% nachfixiert wurde. Die Inkubationen erfolgten auch an Rattengewebe (für die Austestung der Immunseren wurde Mausgewebe genutzt), wobei sich eine äquivalente Markierung zu dem Mausgewebe ergab. Daraufhin wurde in den weiteren Versuchsreihen ausschließlich Rattengewebe für die Inkubationen verwendet. Um die während der Immunisierungszeit genutzte Inkubationsmethode zu verbessern, wurden an den einzelnen Inkubationsschritten Änderungen vorgenommen, um ein besseres Ergebnis zu erzielen, oder um die Methode zu vereinfachen. So wurden einige Waschschrte hinzugefügt und das Gewebe wurde gekocht.

Der Kochvorgang bewirkte eine bessere Durchlässigkeit der Zellmembranen, wodurch die Antikörper leichter intrazellulär gelegene Strukturen markieren konnten. Um den Kochschritt zu optimieren, wurden verschiedenen Kochmethoden ausgetestet:

- 30minütiges Kochen in Tris-Puffer pH 8,0 auf einer Kochplatte
- 1stündiges Kochen in Tris-puffer pH 8,0 auf einer Kochplatte
- 30minütiges Kochen in Tris-Puffer + 10 % HCl (Salzsäure) auf einer Kochplatte
- 30minütiges Kochen in 10 mM Zitronensäure auf einer Kochplatte
- 5minütiges Kochen bei 800 Watt in einer Mikrowelle

Der morphologische Erhalt des Gewebes wurde durch ein abschließendes Nachfixieren in 4% PFA verbessert.

2.3.1.2 Optimierte Inkubationsprotokoll

Das zu untersuchende Gewebe wurde mittels eines Kryostaten (CM 1900, Leica, Bensheim) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und diese auf Objekträger SuperFrost Plus (R. Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen. Das native Gewebe wurde für 15 min in kaltem PFA 4% fixiert. Dem Fixieren folgte ein Waschschrift in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4) (2 x 10 min) und destilliertem Wasser (1x 10 min). Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in 10 mM Zitronensäure in einer handelsüblichen Mikrowelle bei 800 Watt bis zum Kochen erhitzt und dann nochmals 5 min bei 800 Watt gekocht. Diesem folgte ein 15minütiges Abkühlen bei Raumtemperatur in der Kochflüssigkeit und im Anschluss ein weiterer Waschschrift in PBS (10 min), PBS+ 0,1% Triton X 100 (10 min) und nochmals in PBS (10 min). Nach dem Blocken unspezifischer Bindungen mit „Histoblock“ (siehe Lösungen und Puffer) für eine Stunde folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern der Tiere, die das beste Inkubationsergebnis zeigten (siehe Tabelle 1), über Nacht. Dem Waschen (PBS 3x 10 min) am folgenden Tag folgte das Inkubieren der Schnitte mit Sekundäantikörpern (s. Tab. 3) in PBS+S für eine Stunde im Dunkeln. Diesem schloss sich nochmals ein Waschschrift (2x 10 min in PBS) an sowie ein 10minütiges Nachfixieren in PFA 4% und ein weiterer Waschschrift (2x 10 min in PBS). Danach wurden die Schnitte mit carbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4°C dunkel gelagert.

Antigen	Wirtspezies	Verdünnung
SDHA	Kaninchen, polyklonal (Tier 1)	1:400
SDHB	Maus, monoklonal Klon 21A11	1:200
SDHB	Kaninchen, polyklonal (Tier 2)	1:200
SDHC	Kaninchen, polyklonal (Tier 1)	1:200
α -Smooth-muscle-actin	Maus, monoklonal Klon 1A4, FITC-konjugiert	1:500

Tab. 1: Verwendete Primärantikörper bei der Datengewinnung

2.4 Immunhistochemische Doppelinkubation

Nach der Behandlung des Gewebe wie oben beschrieben, wurden die Schnitte zur zweifelsfreien Identifikation von glatten Muskelzellen vor dem Fixierungsschritt nochmals für eine Stunde mit einem primären FITC-konjugierten Antikörper, gerichtet gegen α -Smooth-muscle-actin, inkubiert. Diesem folgte ein Waschschrift (2x 10 min in PBS), ein 10minütiges Nachfixieren in PFA 4 % und ein weiterer Waschschrift (10 min in PBS). Danach wurden die Schnitte wie oben beschrieben eingedeckelt und gelagert.

2.5 Verwendete Primärantikörper

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Quelle
SDHA	Kaninchen, polyklonal (Tier 1)	1:400	Diese Arbeit
SDHA	Kaninchen, polyklonal (Tier 2)	1:400	Diese Arbeit
SDHB	Maus, monoklonal Klon 21A11	1:200	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
SDHB	Kaninchen, polyklonal (Tier 1)	1:200	Diese Arbeit
SDHB	Kaninchen, polyklonal (Tier 2)	1:200	Diese Arbeit
SDHC	Kaninchen, polyklonal (Tier 1)	1:200	Diese Arbeit
SDHC	Kaninchen, polyklonal (Tier 2)	1:200	Diese Arbeit
SDHD	Kaninchen, polyklonal (Tier 1)	1:400	Diese Arbeit
SDHD	Kaninchen, polyklonal (Tier 2)	1:200	Diese Arbeit
SDHA	Meerschweinchen, polyklonal	1:400	Diese Arbeit
SDHB	Meerschweinchen, polyklonal	1:400	Diese Arbeit
SDHC	Meerschweinchen, polyklonal	1:400	Diese Arbeit
SDHD	Meerschweinchen, polyklonal	1:1600	Diese Arbeit
Complex V-subunit- α	Maus, monoklonal Klon 7H10	1:200	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
α -Smooth-muscle-actin	Maus, monoklonal Klon 1A4, FITC-konjugiert	1:500	Sigma, Deisenhofen

Tab. 2: Verwendete Primärantikörper

2.6 Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy-3	1:2000	Dianova, Hamburg
Maus-IgG	Esel	Cy-3	1:1000	Dianova, Hamburg
Meerschweinchen-IgG	Esel	Cy-3	1:2000	Dianova, Hamburg

Tab. 3: Verwendete Sekundärantikörper

2.7 Präabsorptionskontrolle der immunhistochemischen Markierungen

Zur Bestimmung der Spezifität der Markierungen wurden 40 mg des dem Antikörper zugehörigen Peptids in 400 µl 10% Dimethylformamid gelöst und mit 3600 µl Aqua dest. auf 4000 µl aufgefüllt. Dies ergab dann eine Lösung mit 1 mg Peptid/ml Lösung. Für die Präabsorption wurde zu 100 µl Antikörperlösung in spezifischer Verdünnung 2 µl der Peptidlösung dazugegeben. Der Ansatz wurde dann über Nacht bei 4°C stehen gelassen, um den Antikörper abzubinden. Am darauf folgenden Tag wurden Gewebeschnitte mit diesem Ansatz inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde Antiserum ohne Peptidzugabe benutzt. Als spezifisch wurden nur Markierungen angesehen, die durch Zugabe des Peptids verhindert werden konnten.

2.8 SDH Histochemie

Das entnommene und präparierte Gewebe (n = 5 Tiere) wurde mittels eines Kryostaten (CM 1900, Leica, Bensheim) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und auf unbeschichtete Objektträger (Menzelgläser, Braunschweig) aufgezogen, um eine Hintergrundfärbung zu vermeiden. Die Schnitte wurden dann 5 min in einem Trockenschrank bei 37° getrocknet. Anschließend folgte eine Fixierung in 0°C kaltem Aceton für 5 min und nochmals ein Trocknungsschritt von 5 min bei 37°C. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in das zuvor vorbereitete Medium (SDH-Medium) (siehe Lösungen und Puffer) + 0,025 g PMS (Phenazine Methosulfat) in 5 ml Aqua dest. gegeben und jeweils 5 Schnitte für 5 min und 5 Schnitte für 40 min bei 37°C inkubiert. Diesem folgte ein Abbruchschritt von 30 sec in 0,9% NaCl + NaN₃, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Schnitte wurden dann in Aqua bidest gewaschen (2x 5 min) und anschließend in Kaisers Gelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Bis zur Auswertung wurden die Schnitte im Kühlschrank bei + 4°C gelagert.

2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axioplan 2 imaging; Zeiss, Jena). Quantitativ untersucht wurden Herzmuskelzellen, Alveolarsepten, Koronargefäße, die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße (<100 µm), die glatte Muskulatur der kleinen Bronchi, Fettgewebe und Bronchialepithel. Die glatte Muskulatur wurde dabei anhand ihrer Markierung mit dem α -Smooth-muscle-actin-Antikörper identifiziert. Das zu untersuchende Gewebe wurde im Schnitt aufgesucht, mit dem 40er Objektiv dargestellt (Erregungsfilter BP 545-580 nm, Sperrfilter LP 610 nm) und mit einer Belichtungszeit von 200 ms in 4facher Verstärkung in schwarz-weiß Abstufungen digital dargestellt. Die Auswertung des digitalen Bildes erfolgt mit dem Programm Axiovision (Zeiss, Jena), mit dem sich die Helligkeiten auf einer Grauwertskala von 0-255 darstellen lassen. Die zu messenden Bereiche wurden umfahren und der vom Computer errechnete Mittelwert zur Auswertung genutzt.

Um den Umfang der kleinsten zulässigen Stichprobe zu schätzen, wurde ein statistisches Verfahren angewendet, welches auf dem Begriff des Mutungsintervalles beruht. Bei diesem Verfahren wird der Stichprobenumfang so groß gewählt, dass die Streuung der verschiedenen möglichen Stichprobenmittelwerte um den wirklichen Mittelwert der Grundgesamtheit eine festgelegte Grenze nicht überschreitet. Basierend auf einem Vorschlag von Sitte wird während der Messung fortlaufend der Mittelwert aus der Gesamtheit der bisherigen Messungen gebildet, und zwar so lange, bis die neu hinzukommenden Messwerte nur noch minimale Schwankungen verursachen (Baur 1969). Dies bedeutet, dass der Stichprobenumfang so groß sein soll, dass ein zufälliges Auftreten eines Extremwertes ($\bar{X} \pm 3x$ Standardabweichung) in der letzten Messung den Mittelwert der vorherigen Messungen um nicht mehr als 5 % verändern würde. Basierend auf dieser Methode wurde nach jeder Messung der Mittelwert aus den bisherigen Messungen sowie der nachfolgende Mittelwert unter der Annahme eines Extremwertes gebildet. Die Messung würde dann unabhängig von der bisherigen Anzahl der gemessenen Werte beendet, wenn der theoretisch angenommene Extremwert den Mittelwert nicht mehr als 5% verändert hätte.

2.10 Lichtmikroskopie

Die Auswertung der enzymhistochemisch behandelten Gewebeschnitte (siehe oben) erfolgt mittels eines Lichtmikroskops (Axioplan 2 imaging, Zeiss). Quantitativ untersucht wurden Herzmuskelzellen, Alveolarepten, Koronargefäße, die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße, die glatte Muskulatur der kleinen Bronchi, Fettgewebe und Bronchialepithel. Das zu untersuchende Gewebe wurde im Schnitt aufgesucht, mit dem 40er Objektiv dargestellt, mit einer Belichtungszeit von 20 ms fotografiert und in 4facher Verstärkung in schwarz-weiß Abstufungen digital dargestellt. Die Auswertung des digitalen Bildes erfolgte mit dem Programm Axiovision, mit dem sich die Helligkeiten auf einer Grauwertskala von 0-255 darstellen lassen. Die zu messenden Bereiche wurden umfahren und der vom Computer errechnete Mittelwert zur Auswertung genutzt.

Die Schätzung des kleinsten zulässigen Stichprobenumfangs erfolgt wie oben (2.9 Fluoreszenz-mikroskopie) beschrieben.

2.11 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der Messergebnisse wurde das Programm SPSS 13.0 (SPSS GmbH Software, München) verwendet. Die gemessenen Daten (Helligkeitsintensitäten ausgedrückt als Grauwerte auf einer Skala von 0 bis 250) der immunhistochemischen Inkubationen mit den Antikörpern gegen SDHA, SDHB (monoklonal), SDHB (polyklonal), SDHC und Complex V-subunit- α sowie der SDH-Histochemie, im folgenden absolute Markierungsintensität (AM) genannt, wurden einer explorativen Datenanalyse unterzogen und mit dem globalen Friedman-Test für abhängige Stichproben auf Unterschiede innerhalb der Gesamtheit der Gruppe bei folgenden Geweben geprüft: Herzmuskelzellen, Alveolarepten, Koronargefäße, die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße, die glatte Muskulatur der kleinen Bronchi, Fettgewebe und Bronchialepithel. Die so gewonnen Daten wurden in Form von Boxplots dargestellt, in denen jeweils der Minimum-, Maximum-, Medianwerte und die Perzentilen 25 und 75 markiert sind. Mit dem Wilcoxon-Test wurde die AM eines Antikörpers in verschiedenen Geweben (siehe oben) verglichen. Des Weiteren wurde für jede immunhistochemische und histochemische Markierung wie folgt verfahren: Die Markierungsintensität der Herzmuskelzellen wurde als Eichwert auf 100% gesetzt und für die anderen Gewebe der prozentuale Wert in Bezug auf die Herzmuskelzellen errechnet.

Dieser Wert wurde als relative gewebspezifische Markierungsintensität (RGM) bezeichnet. Die RGM-Werte innerhalb eines Gewebes wurden einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Da es sich um unabhängige Daten handelte, wurden diese dann mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Unterschiede geprüft. Die gewonnenen Daten wurden ebenfalls in Form von Boxplots (Minimum-, Maximum-, Medianwerte sowie den Perzentilen 25 und 75) dargestellt. Mit dem Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben wurden dann die RGM-Werte innerhalb eines Gewebes untereinander verglichen. Unterschiede wurden als signifikant bei $p \leq 0,05$ und als hochsignifikant bei $p \leq 0,01$ angesehen. Der Wilcoxon-Test und der Mann-Whitney-Test wurden nur dann angewandt, wenn die vorangehenden Globaltests (Friedman- bzw. Kruskal-Wallis-Test) signifikante Differenzen innerhalb der Gruppe anzeigten.

2.12 Chemikalien und Reagenzien

Aqua ad injectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Isoflurane	ABOTT, Wiesbaden
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Seelze
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nitroblue Tetrazolium	BIOMOL; Hamburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenazine Methosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserum	Schlachthof Marburg
Succinat Acid Disodium Salt	Fluka Chemie, Buchs, CH
Schweineserum	Schlachthof Marburg
Triton X 100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Zitronensäure	Fluka Chemie, Buchs, CH

2.13 Lösungen und Puffer

2.13.1 Gepuffertes Glycerol

Glycerol und Puffer (50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung, mit 0,5 M Dinatriumcarbonat auf pH 8,6 eingestellt) werden im Verhältnis 2:1 gemischt.

2.13.2 Histoblocklösung

In PBS (siehe unten) werden gelöst: normales Schweineserum (10%), Rinderserum (BSA) (0,1%), Tween 20 (0,5%)

2.13.3 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Für die Herstellung werden zwei Stammlösungen benötigt: Lösung A (27,6 g Natriumdihydrogenphosphat in 1l Aqua dest.) und Lösung B (35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1l Aqua dest.). Für die Gebrauchslösung werden 28,75 ml der Lösung A mit 96,20 ml der Lösung B vermischt. Nach Zugabe von 22,4 g Natriumchlorid wird die Lösung auf 5000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und auf einen pH von 7,4 eingestellt.

2.13.4 Phosphatgepufferte Salzlösung +NaCl (PBS+S)

PBS wird mit 4,48 g/l NaCl versetzt.

2.13.5 Phosphatpuffer 0,1 M (PP)

115 ml Stammlösung A (31,2 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) und 385 ml Stammlösung B (35,6 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) werden gemischt und mit 500 ml Aqua dest. aufgefüllt. Dann wird der pH auf 7,4 eingestellt.

2.13.6 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2-7,4

40 g Paraformaldehyd werden zusammen mit 500 ml Aqua dest. langsam auf 70°C erhitzt und dann einige Tropfen 2 M NaOH zugegeben, bis die Lösung klar wird. Nach dem Erkalten werden 500 ml 0,2 M PP dazugegeben, der pH auf 7,2-7,4 eingestellt und die Lösung zweimal durch eine Membran (Schleider&Schuell GmbH, Dassel) filtriert (1x 3µm und 1x 0,6 µm Dicke).

2.13.7 SDH-Medium

Für die Herstellung werden 3 Lösungen benötigt.

Lösung 1: 50 ml 200 mM KH_2PO_4 (= 1,36 g) werden in 50 ml Aqua dest. gelöst,

150 ml 200 mM K_2HPO_4 (= 8,1 g nicht wasserfrei) werden in 300 ml Aqua dest. gelöst und damit dann die Lösung A auf pH 7,6 eingestellt.

Lösung 2: 50 ml 200 mM Succinat Acid Disodium Salt x $6\text{H}_2\text{O}$ = 2,7 g Succinat werden in 50ml Aqua dest. gelöst.

Lösung 3: 50 ml 20 mM $\text{MgCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$ = 0,203 g werden in 50 ml Aqua dest. gelöst.

Lösung 1+2+3 werden gemischt und mit Aqua dest. auf 192 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Danach werden 200 mg NBT dazugegeben, das Ganze in 29,4 Portionen abgefüllt und bei -80°C gelagert.

2.13.8 Zamboni-Fixativ

50 ml 37%ige Formalinlösung werden mit 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer und 150 ml gesättigter Pikrinsäure gemischt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

3. Ergebnisse

3.1 Antikörpergewinnung und Methodenentwicklung

Immunisiert wurden pro Antigen jeweils zwei Kaninchen und ein Meerschweinchen.

3.1.1 SDHA

Das Kaninchen 1 wurde am 130. Immunisierungstag ausgeblutet, das Kaninchen 2 sowie das Meerschweinchen wurden am 100. Immunisierungstag ausgeblutet. Die Ergebnisse der Austestungen der Antikörper sind in folgender Tabelle 4 dargestellt.

Tier	30. Immunisierungstag	60. Immunisierungstag	90. Immunisierungstag	120. Immunisierungstag
Kaninchen 1	(+)	+	++	+++
Kaninchen 2	-	(+)	+++	
Meerschweinchen	-	+	+++	

Tab. 4: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHA (AS 581-624). sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Präabsorption

Die Seren der getöteten Tiere wurden mittels Präabsorption auf ihre Spezifität getestet (Abb. 1). Die Ergebnisse dieser Präabsorption sind in unten stehender Tabelle 5 zusammengefasst.

Tier	Positivkontrolle ohne Peptid	Präabsorption mit Peptid
Kaninchen 1	+++	-
Kaninchen 2	++	-
Meerschweinchen	+	-

Tab. 5: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHA (AS 581-624) im Rahmen der Testung der Spezifität.
 sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

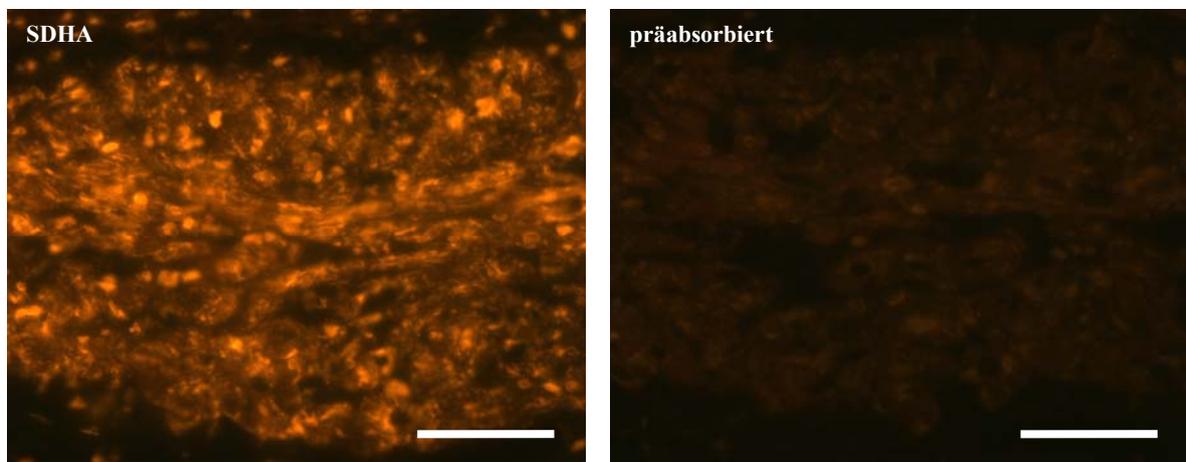


Abb. 1: Die punktförmige Markierung der Herzmuskelzellen mit dem SDHA-Antikörper lässt sich durch Präabsorption mit dem korrespondierenden synthetischen Peptid vollständig verhindern.
 Maßstab = 50 µm

Lagerungsfähigkeit

Die gewonnenen Daten der Austestung der Lagerungsfähigkeit der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 6 aufgeführt.

Tier	- 80°C	- 20°C	- 20°C + Glycerol	lyophilisiert
Kaninchen 1	++	+++	++	+++
Kaninchen 2	+++	+++	++	+++
Meerschweinchen	++	++	++	++

Tab. 6: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHA (AS 581-624) im Rahmen der Austestung der Lagerungsfähigkeit.
 sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Affinitätsreinigung

Um die Spezifität der Markierungen zu erhöhen, wurde ein Teil der Antikörper affinitätsgereinigt. Die so gewonnenen Antikörper wurden dann auf ihre Markierungsfähigkeit getestet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 7 dargestellt.

Tier	Markierung in der Immunfluoreszenz
Kaninchen 1	Weiterhin sehr gute Markierungen in allen getesteten Geweben, starke Kernmarkierung
Kaninchen 2	Gute Markierung in allen getesteten Geweben, starke Kernmarkierung
Meerschweinchen	Sehr schwache Markierung in allen getesteten Geweben

Tab. 7: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHA (AS 581-624) nach Affinitätsreinigung des Antikörpers.

3.1.2 SDHB

Das Kaninchen 1 wurde am 130. Immunisierungstag ausgeblutet, das Kaninchen 2 sowie das Meerschweinchen wurden am 100. Immunisierungstag ausgeblutet. Die Ergebnisse der letzten Austestung sind in folgender Tabelle 8 dargestellt.

Tier	30. Immunisierungstag	60. Immunisierungstag	90. Immunisierungstag	120. Immunisierungstag
Kaninchen 1	-	-	++	+++
Kaninchen 2	-	(+)	++	
Meerschweinchen	-	++	+++	

Tab. 8: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHB (AS 158-171). sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Präabsorption

Die Seren der getöteten Tiere wurden mittels Präabsorption auf ihre Spezifität getestet (Abb. 2). Die Ergebnisse dieser Präabsorption sind in unten stehender Tabelle 9 zusammengefasst.

Tier	Positivkontrolle ohne Peptid	Präabsorption mit Peptid
Kaninchen 1	++	-
Kaninchen 2	+++	-
Meerschweinchen	+	-

Tab. 9: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHB (AS 158-171) im Rahmen der Testung der Spezifität. sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

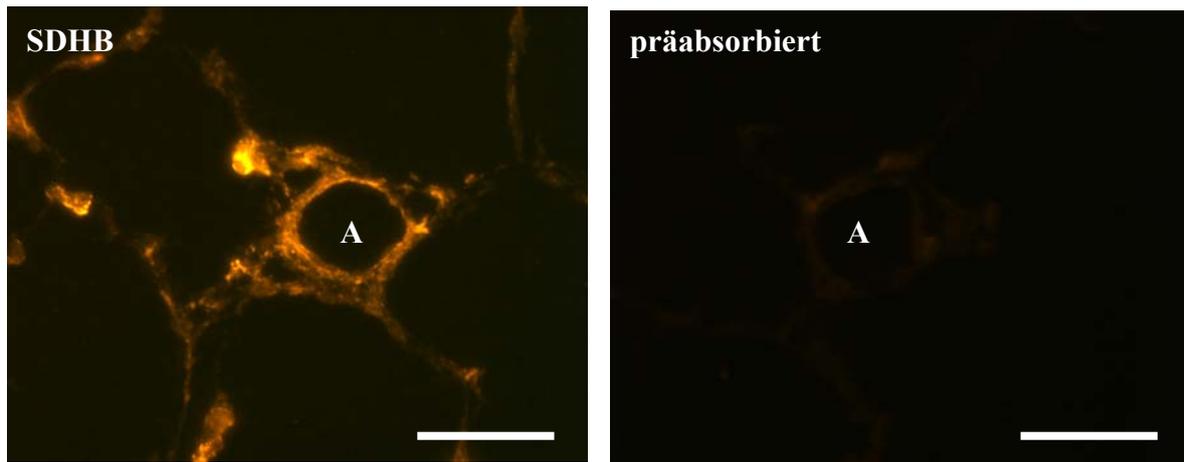


Abb. 2: Alveolarregion der Lunge mit intraazinärer Arterie (A). Die mit dem SDHB-Antikörper erzielte Immunreaktivität ist vollständig präabsorbiert.
Maßstab = 50 µm

Lagerungsfähigkeit

Die gewonnenen Daten der Austestung der Lagerungsfähigkeit der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 10 aufgeführt.

Tier	- 80°C	- 20°C	- 20°C + Glycerol	lyophilisiert
Kaninchen 1	++	+++	++	+++
Kaninchen 2	+++	+++	++	+++
Meerschweinchen	++	++	+	++

Tab. 10: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHB (AS 158-171) im Rahmen der Austestung der Lagerungsfähigkeit.
sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Affinitätsreinigung

Die immunhistochemischen Eigenschaften nach der Affinitätsreinigung der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 11 aufgeführt.

Tier	Markierung in der Immunfluoreszenz
Kaninchen 1	Gute Markierung, aber mit fraglichem Hintergrund
Kaninchen 2	Sehr gute Markierung in allen getesteten Geweben
Meerschweinchen	Schwache Markierung im Herzmuskel und im Bronchialepithel, die restlichen Gewebe zeigten keine verwertbaren Markierungen

Tab. 11: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHB (AS 158-171) nach Affinitätsreinigung des Antikörpers.

3.1.3 SDHC

Das Kaninchen 1 wurde am 130. Immunisierungstag ausgeblutet, das Kaninchen 2 sowie das Meerschweinchen wurden am 100. Immunisierungstag ausgeblutet. Die Ergebnisse der letzten Austestung sind in folgender Tabelle 12 dargestellt.

Tier	30. Immunisierungstag	60. Immunisierungstag	90. Immunisierungstag	120. Immunisierungstag
Kaninchen 1	-	+	++	+++
Kaninchen 2	-	(+)	++	
Meerschweinchen	-	-	+	

Tab. 12: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHC (AS 29-52). sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Präabsorption

Die Seren der getöteten Tiere wurden mittels Präabsorption auf ihre Spezifität getestet (Abb. 3). Die Ergebnisse dieser Präabsorption sind in unten stehender Tabelle 13 zusammengefasst.

Tier	Kontrolle ohne Peptid	Präabsorption mit Peptid
Kaninchen 1	+++	-
Kaninchen 2	+++	-
Meerschweinchen	+	-

Tab. 13: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHC (AS 29-52) im Rahmen der Testung der Spezifität.
 sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

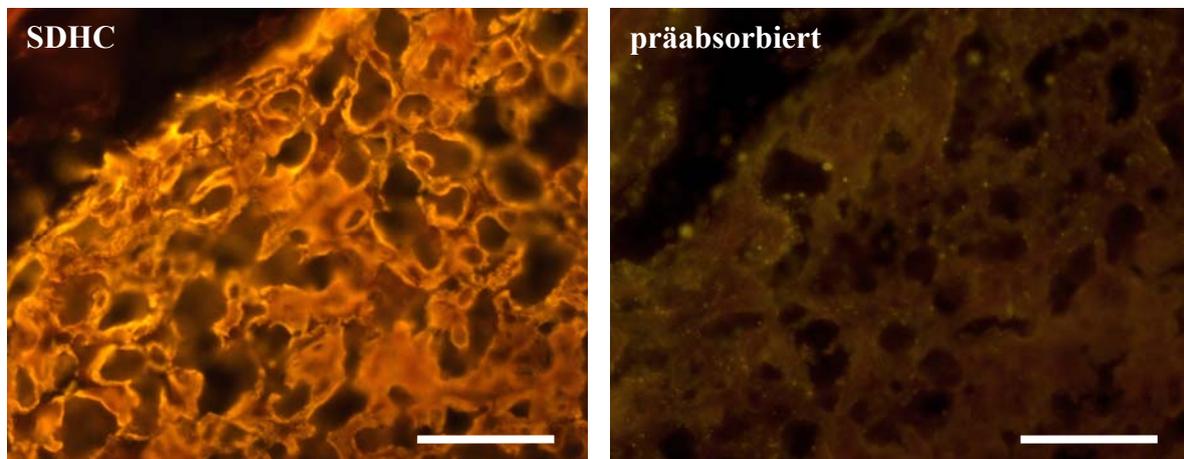


Abb. 3: Plurivakuoläres Fettgewebe. Die mit dem SDHC-Antikörper erzielte Immunreaktivität ist vollständig präabsorbiert.
 Maßstab = 50 µm

Lagerungsfähigkeit

Die gewonnenen Daten der Austestung der Lagerungsfähigkeit der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 14 aufgeführt.

Tier	- 80°C	- 20°C	- 20°C + Glycerol	lyophilisiert
Kaninchen 1	+++	+++	++	+++
Kaninchen 2	+++	+++	++	++
Meerschweinchen	++	++	++	++

Tab. 14: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHC (AS 29-52) im Rahmen der Austestung der Lagerungsfähigkeit.
 sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Affinitätsreinigung

Die immunhistochemischen Eigenschaften nach der Affinitätsreinigung der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 15 aufgeführt.

Tier	Markierung in der Immunfluoreszenz
Kaninchen 1	Sehr gute Markierung in allen Geweben
Kaninchen 2	Gute Markierung in allen getesteten Geweben
Meerschweinchen	Sehr schwache Markierung in allen getesteten Geweben

Tab. 15: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHC (AS 29-52) nach Affinitätsreinigung des Antikörpers.

3.1.4 SDHD

Das Kaninchen 1 wurde am 130. Immunisierungstag ausgeblutet, das Kaninchen 2 sowie das Meerschweinchen wurden am 100. Immunisierungstag ausgeblutet. Die Ergebnisse der letzten Austestung sind in folgender Tabelle 16 dargestellt.

Tier	30. Immunisierungstag	60. Immunisierungstag	90. Immunisierungstag	120. Immunisierungstag
Kaninchen 1	-	-	++	+++
Kaninchen 2	-	(+)	++	
Meerschweinchen	-	(+)	+	

Tab. 16: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHD (AS 34-66). sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Präabsorption

Die Seren der getöteten Tiere wurden mittels Präabsorption auf ihre Spezifität getestet. Die Ergebnisse dieser Präabsorption sind in unten stehender Tabelle 17 zusammengefasst.

Tier	Positivkontrolle ohne Peptid	Präabsorption mit Peptid
Kaninchen 1	(+)	-
Kaninchen 2	(+)	-
Meerschweinchen	-	-

Tab. 17: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHD (AS 34-66) im Rahmen der Testung der Spezifität. sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Lagerungsfähigkeit

Die gewonnenen Daten der Austestung der Lagerungsfähigkeit der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 18 aufgeführt.

Tier	- 80°C	- 20°C	- 20°C + Glycerol	lyophilisiert
Kaninchen 1	+	+	+	+
Kaninchen 2	++	++	++	++
Meerschweinchen	+	+	+	+

Tab. 18: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHD (AS 34-66) im Rahmen der Austestung der Lagerungsfähigkeit.
 sehr intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + + +, intensive Immunfluoreszenzmarkierung = + +, geringe Immunfluoreszenzmarkierung = +, fragliche Immunfluoreszenzmarkierung = (+), keine Immunfluoreszenzmarkierung = -

Affinitätsreinigung

Die immunhistochemischen Eigenschaften nach der Affinitätsreinigung der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle 19 aufgeführt.

Tier	Markierung der Immunfluoreszenz
Kaninchen 1	Kaum noch Markierung mit starkem Hintergrund
Kaninchen 2	Kaum noch Markierungen in allen getesteten Geweben, Spezifität fraglich
Meerschweinchen	Keine spezifische Markierungen mehr, hauptsächlich Hintergrundmarkierung

Tab. 19: Markierung in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Antigen SDHD (AS 34-66) nach Affinitätsreinigung des Antikörpers.

3.2 Western blot

Die SDH-Antikörper wurden mittels Western blot von Frau Dr. Renate Paddenberg auf ihre Spezifität getestet. Die Antikörper gegen die SDH-Untereinheiten A, B und C zeigten eine gute Spezifität gegen das Antigen, der SDHD-Antikörper dagegen zeigte keine spezifische Reaktion. Daher wurde der SDHD-Antikörper für die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen nicht genutzt.

3.3 Immunfluoreszenz

Es wurde von einer intrazellulären Lokalisation der SDH in den Mitochondrien ausgegangen. Dementsprechend wurde bei der Fluoreszenzmikroskopie im Rahmen der Austestung und Auswertung auf eine intrazelluläre, granuläre, fadenförmige Markierung geachtet, wie sie auch im Vergleich mit Antikörpern gegen ein bekanntes Mitochondrienantigen (mitochondriale ATP-Synthase) beobachtet werden konnte. Die glatte Muskulatur der Bronchi und der Blutgefäße wurde zur besseren Differenzierung gegenüber anderen Strukturen simultan mit einem FITC-konjugiertem monoklonalen Antikörper gegen α -Smooth-muscle actin dargestellt (Abb. 4).

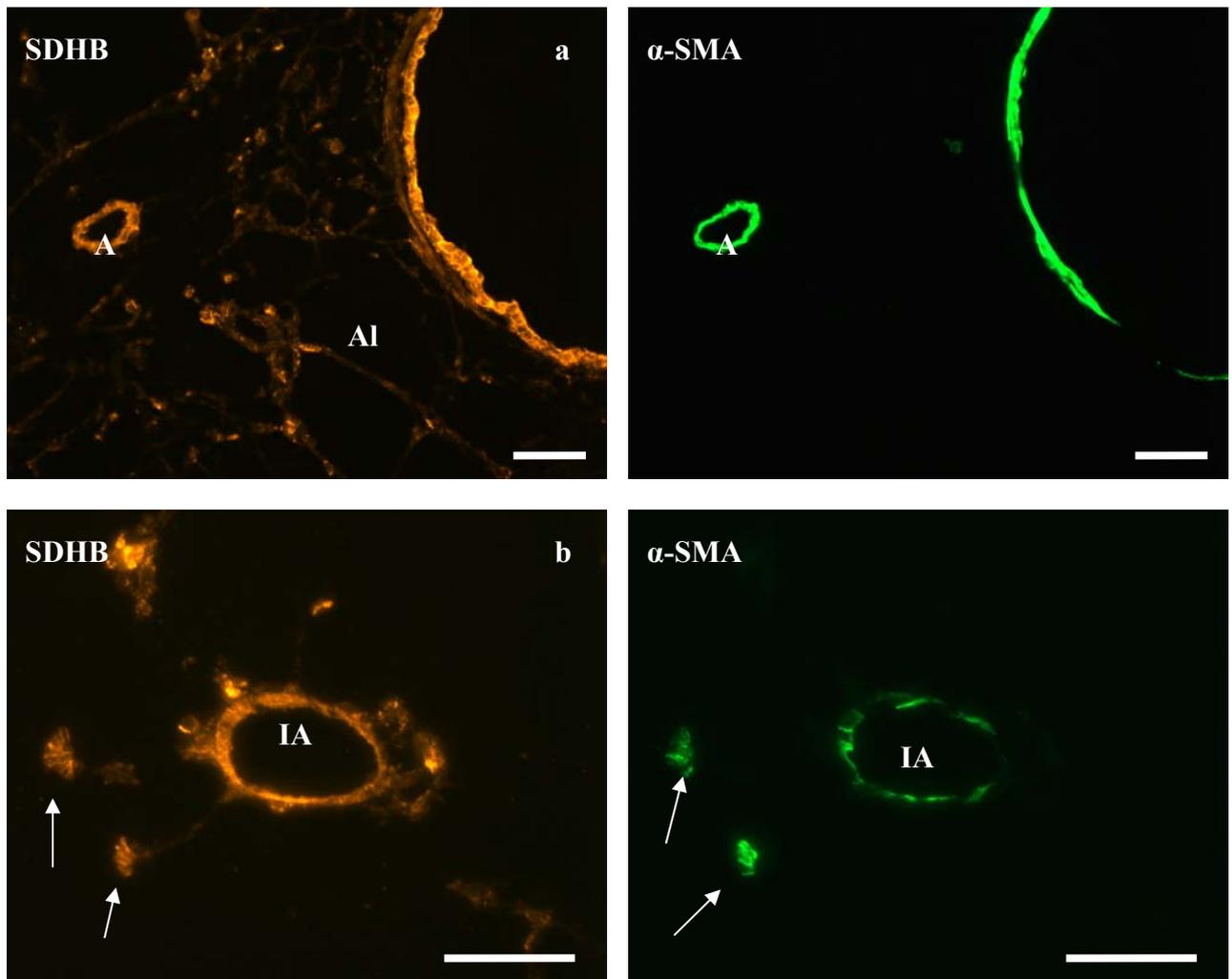


Abb. 4: Lunge; Doppelimmunfluoreszenz mit dem SDHB- und dem α -Smooth-muscle actin-Antikörper.

a: Die glatte Muskulatur von Bronchus (B) und kleiner Lungenarterie (A) ist eindeutig zu identifizieren. Al = Alveole.
 Maßstab = 20 μ m

b: In den intra-azinären Arterien (IA) ist die glatte Muskulatur (α -Smooth-muscle actin (α -SMA) positiv) diskontinuierlich.
 Pfeil = glatte Muskelzellen im Alveolarring.
 Maßstab = 50 μ m

3.3.1 SDHA

Herzmuskelzellen

Die Herzmuskelzellen zeigten eine starke, sich körnig darstellende Mitochondrienmarkierung mit Aussparungen im Bereich der Zellkerne.

Koronargefäße

Die Muskulatur der Koronargefäße zeigte ebenso wie die Muskulatur der Lungengefäße und der kleinen Bronchi eine zarte, körnige Mitochondrienmarkierung, jedoch nicht so stark ausgeprägt. Der Endothelüberzug zeigte eine dezente, aber gut abgrenzbare Markierung (Abb. 6). Die absolute Markierungsintensität (AM) der Koronargefäße entsprach ca. 50 % der der Herzmuskelzellen; sie war signifikant schwächer als die AM der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi und unterschied sich nicht signifikant von der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße (Abb. 5).

Lungengefäße

Wie auch bei der Bronchialmuskulatur, zeigte die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße eine feinkörnige Markierung der Mitochondrien auf homogenem, leicht markiertem Hintergrund. Das Gefäßendothel zeigte eine etwas stärkere, homogene Markierung (Abb. 6). Die AM unterschied sich nicht signifikant von der der Koronargefäße. Ein signifikanter Unterschied der AM war gegenüber der glatten Muskulatur der Bronchi zu beobachten. Hierbei lagen die Messwerte in einem engeren Bereich, im direkten Vergleich der gepaarten Werte wurden jedoch stets innerhalb eines Schnittes in den Lungengefäßen niedrigere Werte gemessen. Auch im Vergleich mit der AM des Bronchialepithels zeigten sich niedrigere Werte. Gegenüber den Alveolarsepten zeigten sich jedoch signifikant höhere Werte (Abb. 5).

Bronchialmuskulatur

Die glatte Muskulatur in den kleinen Bronchi zeigte eine sehr feinkörnige Mitochondrienmarkierung auf homogenem, leicht markiertem Hintergrund (Abb. 6). Verglichen wurde die AM der glatten Muskulatur der Bronchi mit der AM der glatten Muskulatur der Lungengefäße und der AM der Koronargefäße. Dabei zeigte sich im Vergleich mit den Koronargefäßen und der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße ein signifikanter Unterschied.

Die Bronchialmuskulatur zeigte jeweils eine stärkere AM. Des Weiteren war die AM der Bronchialmuskulatur stärker als die AM der Alveolarsepten und war signifikant schwächer als die des Bronchialepithels und des Fettgewebes (Abb. 5).

Bronchialepithel

Zu erkennen war eine starke, zum Teil homogene Markierung des gesamten Bronchialepithels mit Ausnahme der Zilien. Durch die sehr starke Markierung waren keine Mitochondrien abgrenzbar (Abb. 6). Im Vergleich der AM zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu der glatten Muskulatur der Bronchi (siehe oben). Die AM-Werte des Bronchialepithels waren etwa fünfmal so hoch wie die der Alveolarsepten. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich mit der AM des plurivakuolären Fettgewebes (Abb. 5).

Alveolen

In den Alveolarsepten zeigte sich eine feinkörnige Mitochondrienmarkierung. Die Typ-II Zellen der Lunge sowie die in den Alveolen liegenden Makrophagen wiesen eine starke Markierung mit zum Teil körniger Mitochondrienmarkierung auf. Auch die angeschnittene glatte Muskulatur der Bronchi war stark, bisweilen körnig markiert (Abb. 6). Der Vergleich der AM der Alveolen mit der AM des Bronchialepithels, der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße sowie der glatten Muskulatur der Bronchi zeigte jeweils einen signifikanten Unterschied bei der glatten Muskulatur der Lungengefäße und Bronchi und einen hochsignifikanten Unterschied zum Bronchialepithel. Die AM der Alveolarsepten hatte gegenüber allen gemessenen Geweben einen geringeren Wert (Abb. 5).

Plurivakuoläres Fettgewebe

Das plurivakuoläre Fettgewebe zeigte eine sehr starke Markierung mit Aussparung der Fetttropfen (Abb. 6). Wie bereits oben beschrieben, ließ sich im Vergleich der AM mit der des Bronchialepithels kein signifikanter Unterschied erkennen. Das Fettgewebe zeigte gegenüber allen anderen Geweben, mit Ausnahme des Bronchialepithels, einen höheren AM-Wert (Abb. 5).

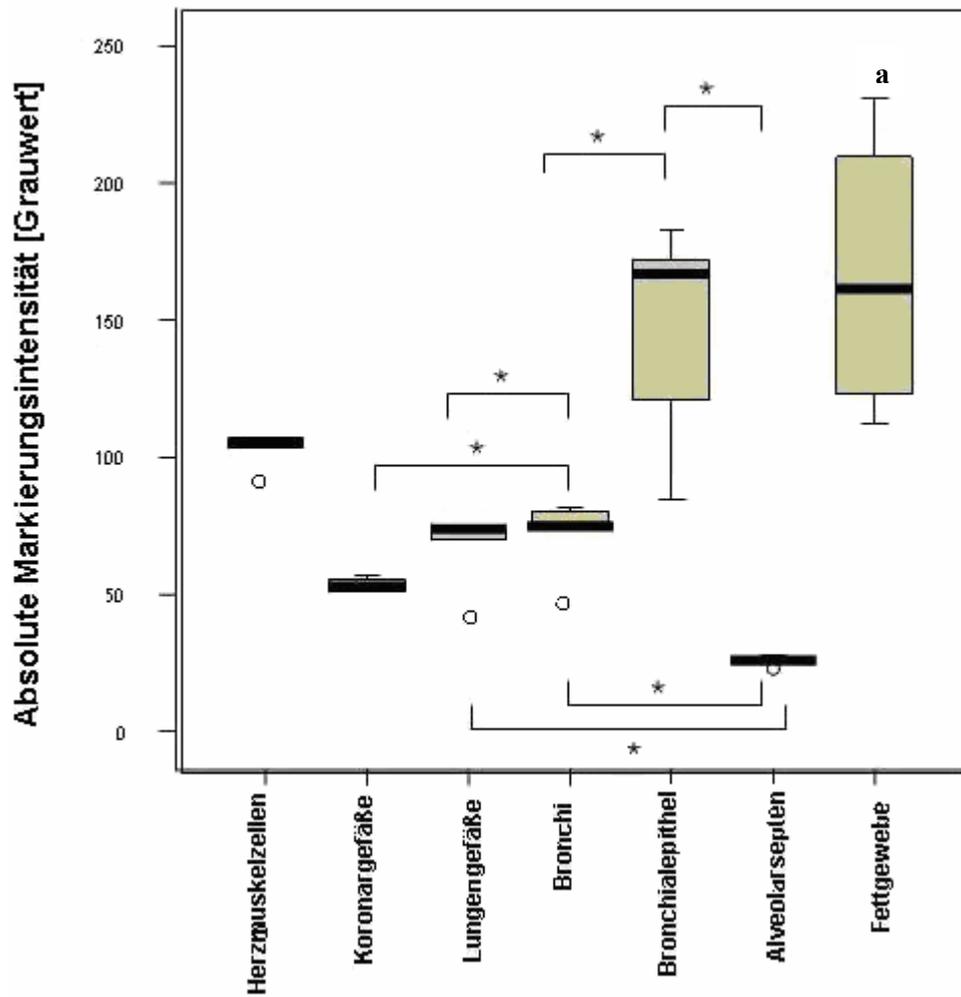
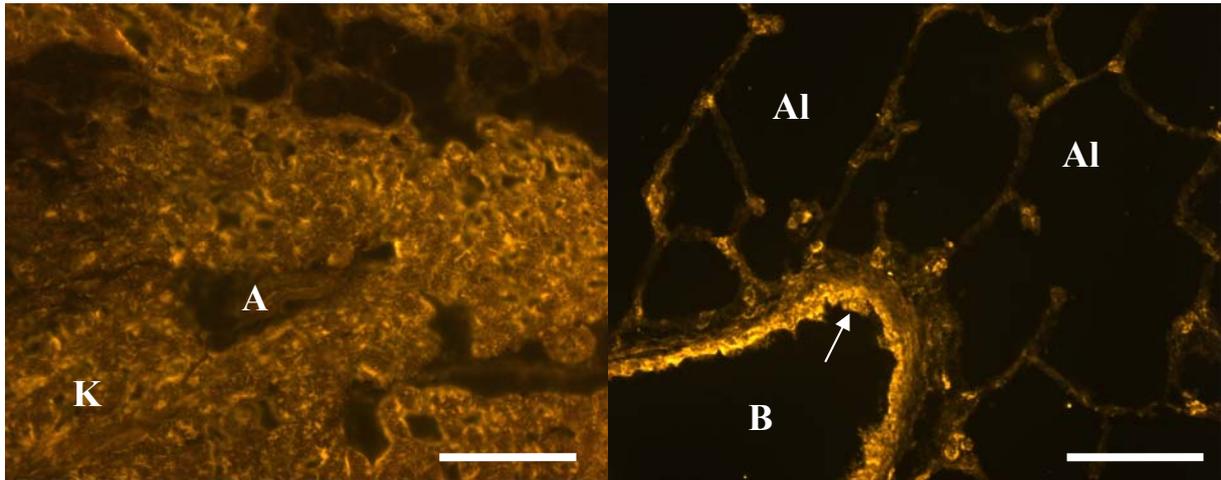
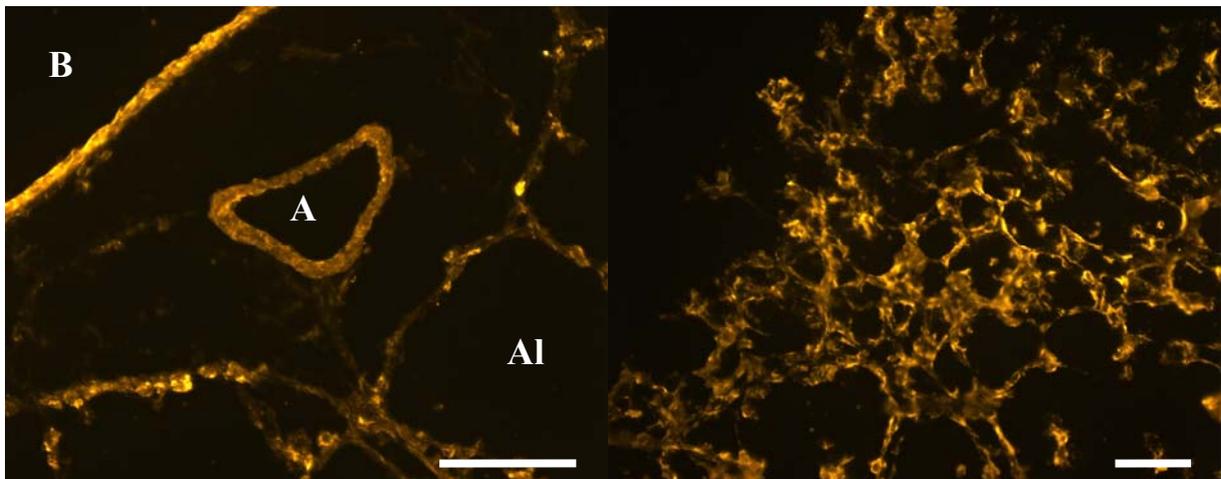


Abb. 5: AM des Antikörpers gegen die Untereinheit SDHA: Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentilen 25 und 75 der Immunfluoreszenz der Herzmuskelzellen, der Koronargefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi, des Bronchialepithels, der Alveolarsepten und des plurivakuolären Fettgewebes sind in Boxplots dargestellt. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Test nach vorangegangenem Friedman-Test mit $p \leq 0,05$), \circ = Ausreißerwerte. **a** = signifikant höhere Werte gegenüber allen anderen Geweben, mit Ausnahme des Bronchialepithels



Herzmuskel:
A = Arterie; K = Kardiomyozyt

Lunge:
Al = Alveolen; B = Bronchus;
Pfeil = Bronchialepithel



Lunge:
A = kleine Lungenarterie; B = Bronchus;
Al = Alveole

Plurivakuoläres Fettgewebe

Abb. 6: Immunhistochemische Darstellung der SDHA mittels des polyklonalen Antikörpers.
Maßstab (groß) = 50 µm; Maßstab (klein) = 20 µm

3.3.2 SDHB-monoklonal

Herzmuskelzellen

Die Herzmuskelzellen zeigten eine starke, sich körnig darstellende Mitochondrienmarkierung mit Aussparungen im Bereich der Zellkerne (Abb. 8).

Koronargefäße

Die Muskulatur der Koronargefäße zeigte ebenso wie die Muskulatur der Lungengefäße und der kleinen Bronchi eine zarte, körnige Mitochondrienmarkierung, jedoch nicht so stark ausgeprägt. Den Endothelüberzug konnte man anhand einer dezenten Markierung gut abgrenzen (Abb. 8). In der absoluten Betrachtung (Abb. 7) entsprach die AM der Koronargefäße etwa der Hälfte der AM der Herzmuskelzellen. Auch war sie im Rahmen dieser Betrachtungsweise schwächer als die AM der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und der Bronchi, des plurivakuolären Fettgewebes und des Bronchialepithels und stärker als die AM der Alveolen. Statistisch zeigte sich jedoch auf Grund der Spannweite der Messwerte nur zu den Bronchi und zum Bronchialepithel ein signifikanter Unterschied.

Lungengefäße

Wie auch bei SDHA zeigte die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße eine feinkörnige Markierung der Mitochondrien auf homogenem, leicht markiertem Hintergrund. Das Gefäßendothel wies eine etwas stärkere, homogene Markierung auf (Abb. 8). Die AM zeigte einen signifikanten Unterschied zu der AM der Alveolarsepten und der glatten Muskulatur der Bronchi. Verglichen mit den Alveolarsepten war die AM stärker, jedoch schwächer als die der Bronchi. Das Ergebnis des Vergleichs mit den Koronargefäßen wurde bereits oben beschrieben (Abb. 7).

Bronchialmuskulatur

Die glatte Muskulatur in den kleinen Bronchi zeigte eine sehr feinkörnige Mitochondrienmarkierung auf homogenem, leicht markiertem Hintergrund (Abb. 8). Der Vergleich der AM der glatten Muskulatur der Bronchi mit der AM der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße zeigte einen signifikanten Unterschied, wie auch der Vergleich mit den Alveolarsepten und dem Bronchialepithel. Gegenüber der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und den Alveolarsepten zeigte sich eine signifikant höhere, gegenüber dem Bronchialepithel eine signifikant niedrigere AM (Abb. 7).

Bronchialepithel

Es zeigte sich eine starke, zum Teil homogene Markierung des gesamten Bronchialepithels mit Ausnahme der Zilien. Auf Grund der sehr starken Markierung war keine Mitochondrienmarkierung abgrenzbar (Abb. 8). Im statistischen Vergleich stellte sich ein signifikanter Unterschied zu der glatten Muskulatur der Bronchi sowie zu den Alveolarsepten dar. Die AM des Bronchialepithels war jeweils größer. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der AM des plurivakuolären Fettgewebes (Abb. 7).

Alveolen

Die Alveolarsepten wiesen eine feinkörnige Mitochondrienmarkierung auf. In den Typ-II Zellen der Lunge sowie in den Alveolarmakrophagen zeigte sich eine körnige Mitochondrienmarkierung (Abb. 8). Die AM war signifikant geringer als die des Bronchialepithels. Gegenüber der glatten Muskulatur der Bronchi und der kleinen Lungengefäße zeigte sich eine signifikante schwächere AM (Abb. 7). Insgesamt war die AM der Alveolarsepten gegenüber allen anderen Geweben deutlich schwächer.

Plurivakuoläres Fettgewebe

Das plurivakuoläre Fettgewebe zeigte eine sehr starke Markierung mit Aussparung der Fetttropfen (Abb. 8). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der AM mit der des Bronchialepithel erkennen, hingegen schon gegenüber allen anderen Geweben (Abb. 7).

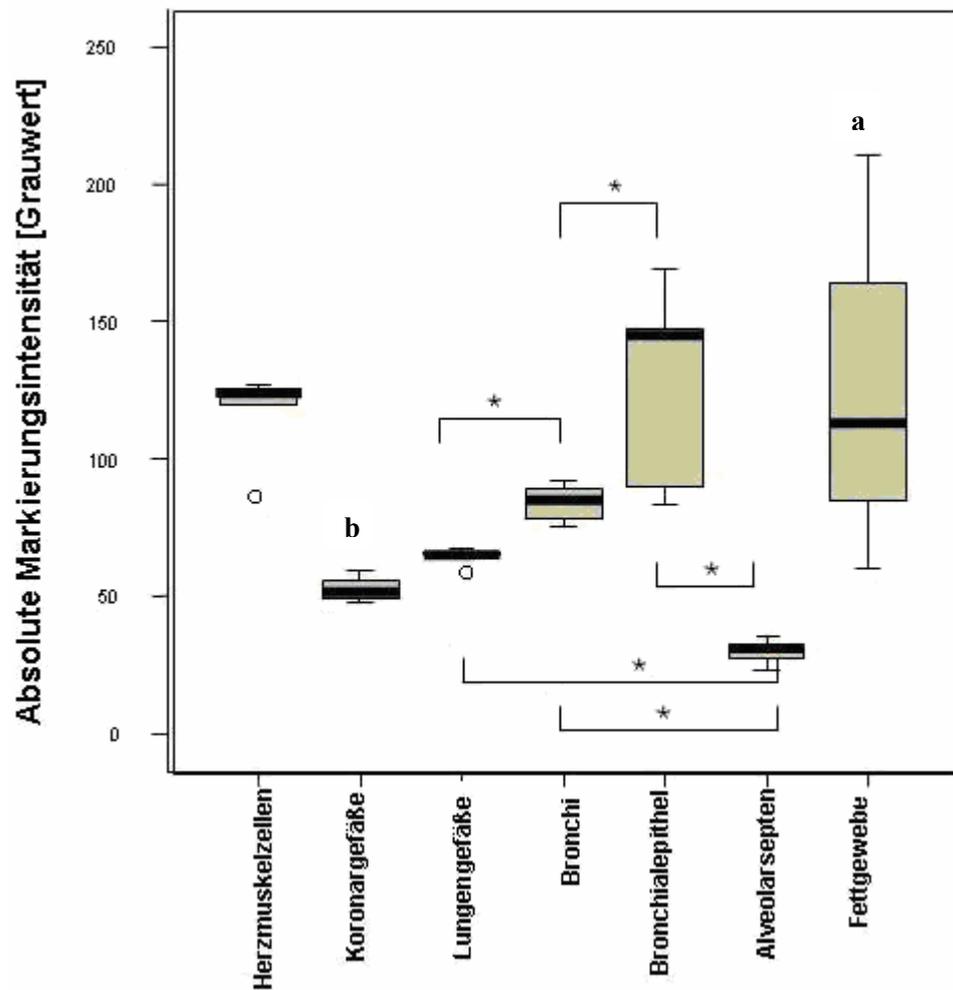
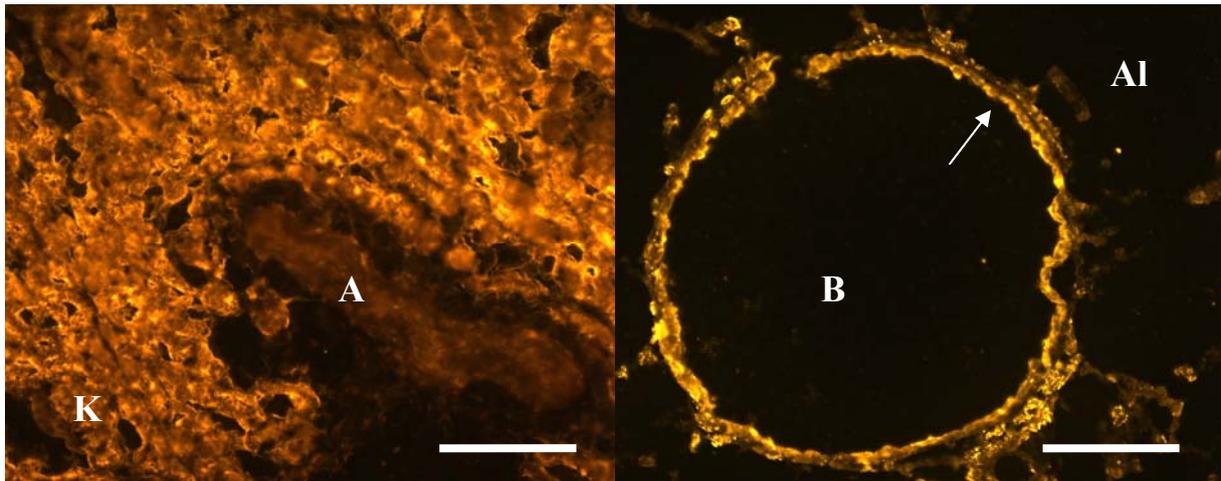
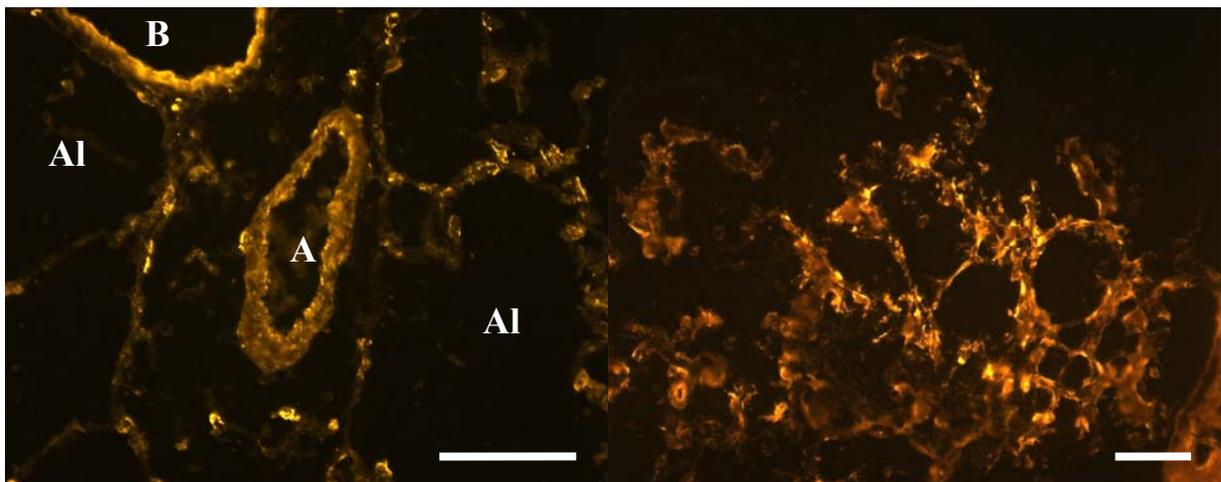


Abb. 7: AM des Antikörpers gegen die Untereinheit SDHB (monoklonal): Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentilen 25 und 75 der Immunfluoreszenz der Herzmuskelzellen, der Koronargefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi, des Bronchialepithels, der Alveolarsepten und des plurivakuolären Fettgewebes sind in Boxplots dargestellt. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Test nach vorangegangenem Friedman-Test mit $p \leq 0,05$), \circ = Ausreißerwerte.
a = signifikant höhere Werte gegenüber allen anderen Geweben, mit Ausnahme des Bronchialepithels
b = signifikant schwächer gegenüber der glatten Muskulatur der Bronchi und des Bronchialepithels



Herzmuskel:
A = Arterie; K = Kardiomyozyt

Lunge:
Al = Alveole; B = Bronchus;
Pfeil = Bronchialepithel



Lunge:
A = Arterie; Al = Alveolen;
B = Bronchus;

Plurivakuoläres Fettgewebe

Abb. 8: Immunhistochemische Darstellung der SDHB mittels des monoklonalen Antikörpers.
Maßstab (groß) = 50 µm; Maßstab (klein) = 20 µm

3.3.3 SDHB-polyklonal

Der monoklonale und der polyklonale SDHB-Antikörper zeigten gleiche immun-histochemische Markierungen bei der Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abb. 8 und Abb. 10). Nachfolgend wird daher nur die statistische Auswertung der mit dem polyklonalen SDHB-Antikörper erzielten Markierungsintensitäten beschrieben.

Koronargefäße

Die AM entsprach ca. 50 % der der Herzmuskelzellen. Im Vergleich mit der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße zeigte sich kein signifikanter Unterschied, die AM der glatten Muskulatur der Bronchi war hingegen signifikant stärker (Abb. 9).

Lungengefäße

Der Vergleich der AM der glatten Muskulatur der Lungengefäße mit der AM der glatten Muskulatur der Bronchi zeigte keinen signifikanten Unterschied, ebenso nicht der Vergleich mit den Alveolarsepten und den Koronargefäßen (Abb. 9).

Bronchialmuskulatur

Wie bereits oben beschrieben, zeigte der Vergleich der AM der glatten Muskulatur der Bronchi mit den Koronargefäßen und dem Bronchialepithel jeweils einen signifikanten Unterschied. Die glatte Muskulatur der Bronchi hatte eine stärkere AM. Kein Unterschied zeigte sich im Vergleich mit den Alveolarsepten und der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße (Abb. 9).

Bronchialepithel

Im statistischen Vergleich der AM zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu der glatten Muskulatur der Bronchi sowie zu den Alveolarsepten. Wie auch bei den bereits zuvor beschriebenen Antikörpern, hatte das Bronchialepithel eine bis zu 50 % höhere AM. Zum plurivakuolären Fettgewebe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 9).

Alveolen

Die AM der Alveolarsepten wurde verglichen mit der AM der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und der Bronchi sowie mit der AM des Bronchialepithel. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind bereits oben beschrieben worden (siehe auch Abb. 9).

Plurivakuoläres Fettgewebe

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu dem Bronchialepithel und auf Grund der Streuung der Messwerte auch kein signifikanter Unterschied zu allen andern Geweben (Abb. 9).

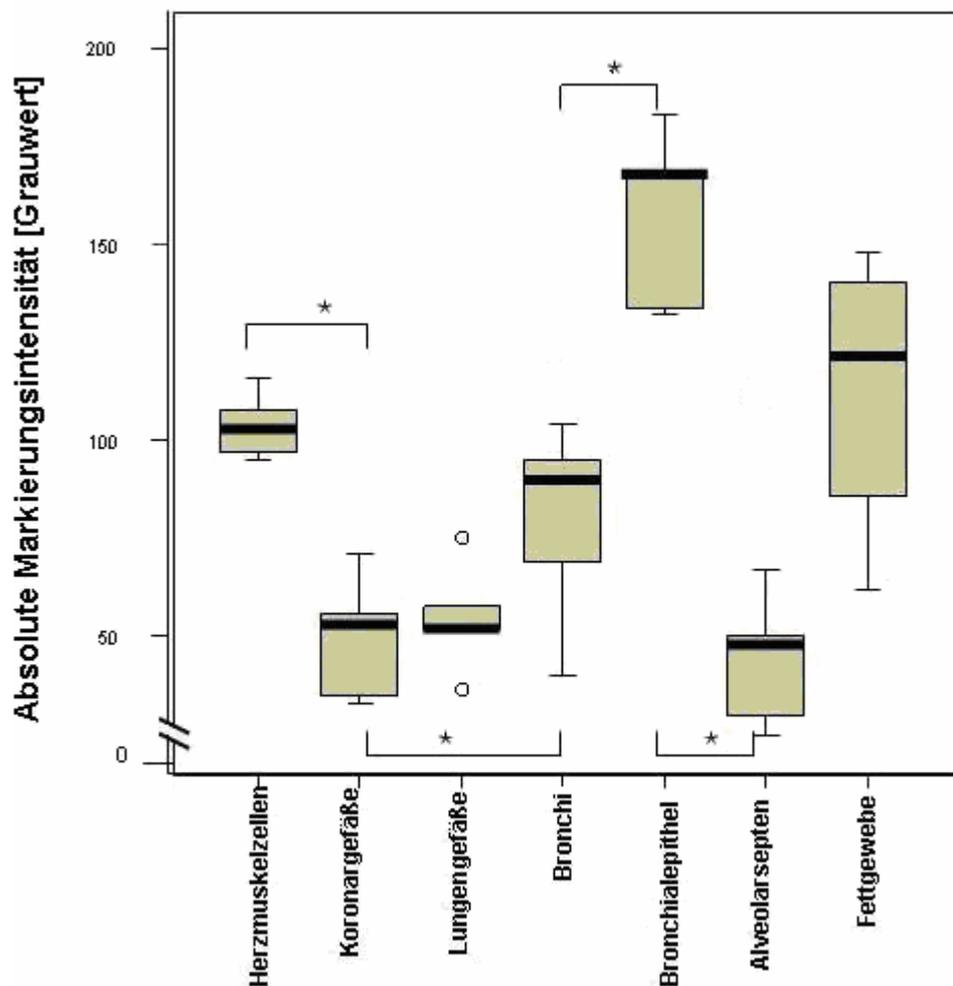
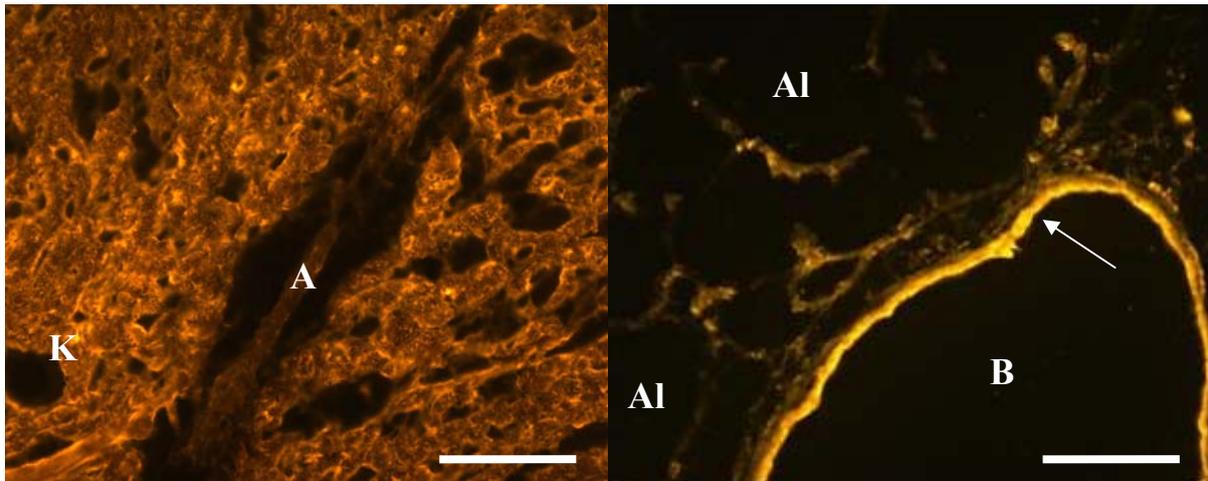
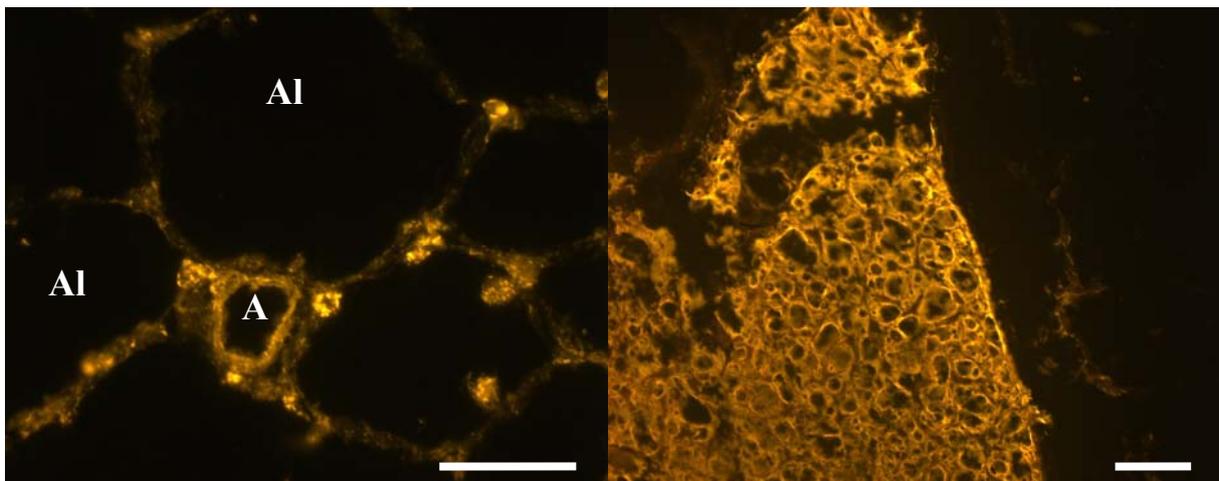


Abb. 9: AM des polyklonalen Antikörpers gegen die Untereinheit SDHB (polyklonal): Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentilen 25 und 75 der Immunfluoreszenz der Herzmuskelzellen, der Koronargefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi, des Bronchialepithels, der Alveolarsepten und des plurivakuolären Fettgewebes sind in Boxplots dargestellt. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Test nach vorangegangenem Friedman-Test mit $p \leq 0,05$), \circ = Ausreißerwerte.



Herzmuskel:
A = Arterie; K = Kardiomyozyt

Lunge:
Al = Alveolen; B = Bronchus;
Pfeil = Bronchialepithel



Lunge:
A = Arterie; Al = Alveolen

Plurivakuoläres Fettgewebe

Abb. 10: Immunhistochemische Darstellung der SDHB mittels des polyklonalen Antikörpers.
Maßstab (groß) = 50 µm; Maßstab (klein) = 20 µm

3.3.4 SDHC

Der polyklonale SDHC-Antikörper zeigte die gleichen immunhistochemischen Markierungen bei der Fluoreszenzmikroskopie wie der monoklonale SDHB-Antikörper und der polyklonale SDHB-Antikörper (siehe Abb. 8 und Abb. 10). Die Vergleiche der Intensität der Immunfluoreszenz mit anderen Geweben zeigten bis auf wenige Ausnahmen dieselben Ergebnisse wie der polyklonale SDHB-Antikörper. Die wenigen Unterschiede sind nachfolgend beschrieben.

Ein signifikanter Unterschied der AM war zwischen der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und den Koronargefäßen zu beobachten. Des Weiteren zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der AM der Koronargefäße und der AM der glatten Muskulatur der Bronchi und der kleinen Lungengefäße (Abb. 11).

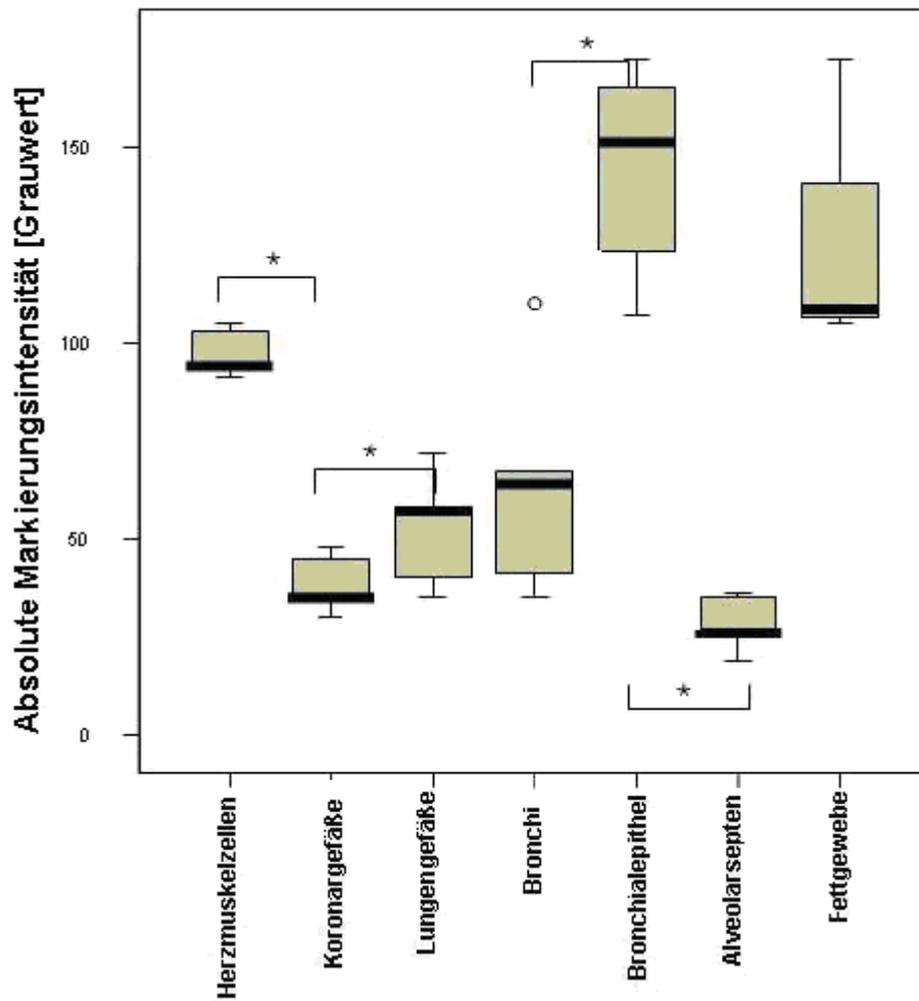
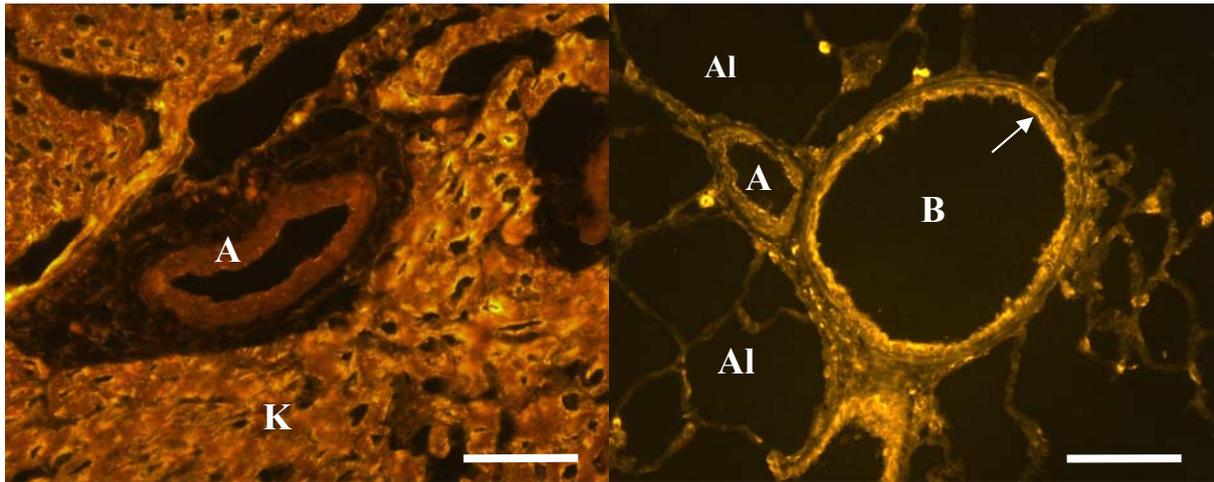
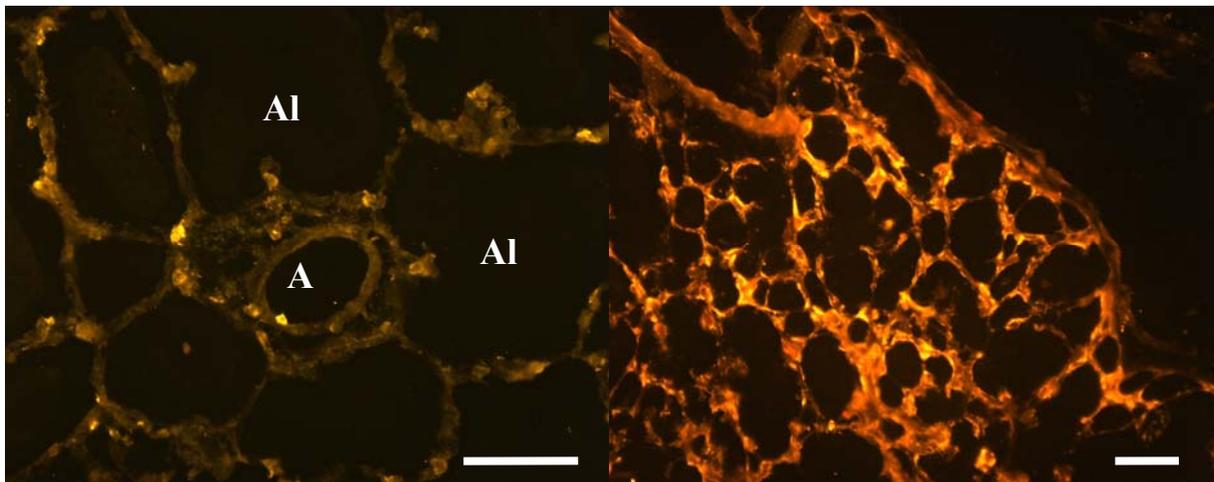


Abb. 11: AM des Antikörpers gegen die Untereinheit SDHC: Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentilen 25 und 75 der Immunfluoreszenz der Herzmuskelzellen, der Koronargefäßen, der glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi, des Bronchialepithels, der Alveolarsepten und des plurivakuoläres Fettgewebes sind in Boxplots dargestellt. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Test nach vorangegangenem Friedman-Test mit $p \leq 0,05$). \circ = Ausreißerwert.



Herzmuskel:
A = Arterie; K = Kardiomyozyt

Lunge:
A = Arterie; Al = Alveolen;
B = Bronchus
Pfeil = Bronchialepithel



Lunge:
A = Arterie; Al = Alveolen

Plurivakuoläres Fettgewebe

Abb. 12: Immunhistochemische Darstellung der SDHC mittels des monoklonalen Antikörpers.
Maßstab (groß) = 50 µm; Maßstab (klein) = 20 µm

3.3.5 Complex V-subunit- α

Herzmuskelzellen

Die Herzmuskelzellen zeigten eine starke, sich körnig darstellende Mitochondrienmarkierung mit Aussparungen im Bereich der Zellkerne und leicht markierte Zellgrenzen (Abb. 14).

KoronargefäÙe

Die Muskulatur der KoronargefäÙe lieÙ, wie auch die Muskulatur der LungengefäÙe und der kleinen Bronchi, eine dezente, körnige Mitochondrienmarkierung erkennen. Der Endothelüberzug war schwach, aber gut abgrenzbar markiert (Abb. 14). Die AM wurde verglichen mit der der Herzmuskelzellen, mit der AM der glatten Muskulatur der Bronchi und der der glatten Muskulatur der kleinen LungengefäÙe. Dabei zeigte sich eine hochsignifikant schwächere AM im Vergleich zu den glatten Muskeln der Bronchi und der LungengefäÙe und eine signifikant schwächere AM im Vergleich zu den Herzmuskelzellen. Bei der absoluten Betrachtung hatten die KoronargefäÙen etwa 25 % der AM der Herzmuskelzellen (Abb. 13).

LungengefäÙe

Wie auch bei der Bronchialmuskulatur, zeigte die glatte Muskulatur der kleinen LungengefäÙe eine feinkörnige Markierung der Mitochondrien auf homogenem, leicht markiertem Hintergrund. Das GefäÙendothel war etwas stärker und homogen markiert (Abb. 14). Der Vergleich der AM der glatten Muskulatur der LungengefäÙe mit der AM der glatten Muskulatur der Bronchi zeigte keinen signifikanten Unterschied. Wie oben schon erwähnt, war ein hochsignifikanter Unterschied zu den KoronargefäÙen und zudem ein signifikanter Unterschied zu den Alveolarsepten zu beobachten. Dabei war jeweils die AM der LungengefäÙe höher als die der anderen Gewebe (Abb. 13).

Bronchialmuskulatur

Die glatte Muskulatur in den Bronchi zeigte eine sehr feinkörnige Mitochondrienmarkierung auf homogenem, leicht markiertem Hintergrund (Abb. 14). Mit der AM der glatten Muskulatur der Bronchi wurde die AM der glatten Muskulatur der kleinen LungengefäÙe, die AM der KoronargefäÙe, die der Alveolarsepten und die des Bronchialepithels verglichen. Es zeigte sich keine Signifikanz gegenüber der glatten Muskulatur der kleinen LungengefäÙe, aber ein signifikanter Unterschied im Vergleich mit den Alveolarsepten (deutlich geringere

AM), den Koronargefäßen (geringere AM) und dem Bronchialepithel (deutlich höhere AM als die glatte Muskulatur der Bronchi) (Abb. 13).

Bronchialepithel

Es zeigte sich eine starke, zum Teil homogene Markierung des gesamten Bronchialepithels mit Ausnahme der Zilien. An manchen Stellen war eine körnige Mitochondrienmarkierung zu erkennen (Abb. 10). Wie oben bereits erwähnt, wurde die AM des Bronchialepithels verglichen mit der der glatten Muskulatur der Bronchi sowie mit der AM des plurivakuolären Fettgewebes und der der Alveolarsepten. Es zeigte sich bei allen Vergleichen eine signifikant geringere AM gegenüber der des Bronchialepithels (Abb. 9).

Alveolen

In den Alveolarsepten war eine schwachkörnige Mitochondrienmarkierung zu beobachten. Die Typ-II Zellen der Lunge sowie die in den Alveolen liegenden Makrophagen zeigten eine starke Markierung mit zum Teil körniger Mitochondrienmarkierung. Auch die angeschnittene glatte Muskulatur der Bronchioli war stark, bisweilen körnig markiert (Abb. 14). Die AM-Vergleiche der Alveolarsepten mit der glatten Muskulatur der kleinen Lungegefäße und der Bronchi sowie des Bronchialepithels zeigten jeweils einen signifikanten Unterschied. Die Alveolarsepten zeigten immer eine schwächere AM (Abb. 13).

Plurivakuoläres Fettgewebe

Das plurivakuoläre Fettgewebe wies kaum Markierungen auf (Abb. 14). Die AM des Fettgewebes wurde mit der AM des Bronchialepithels verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied (Abb. 13).

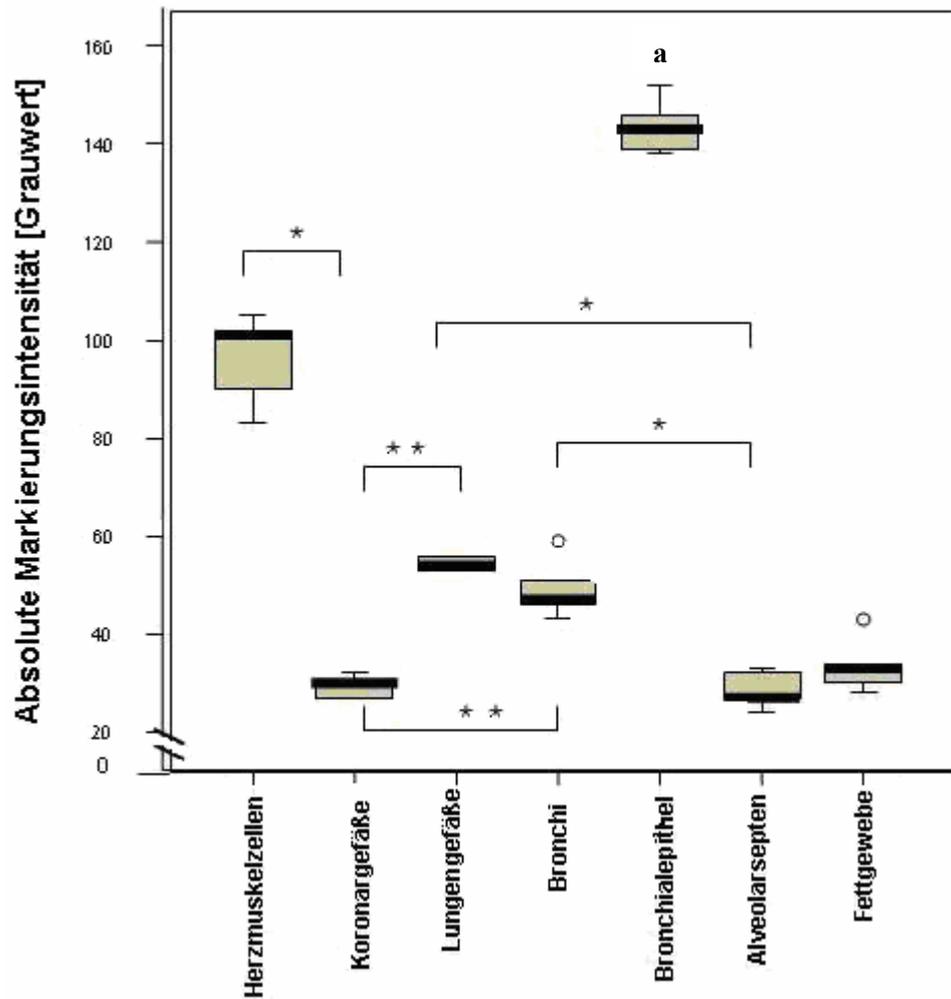
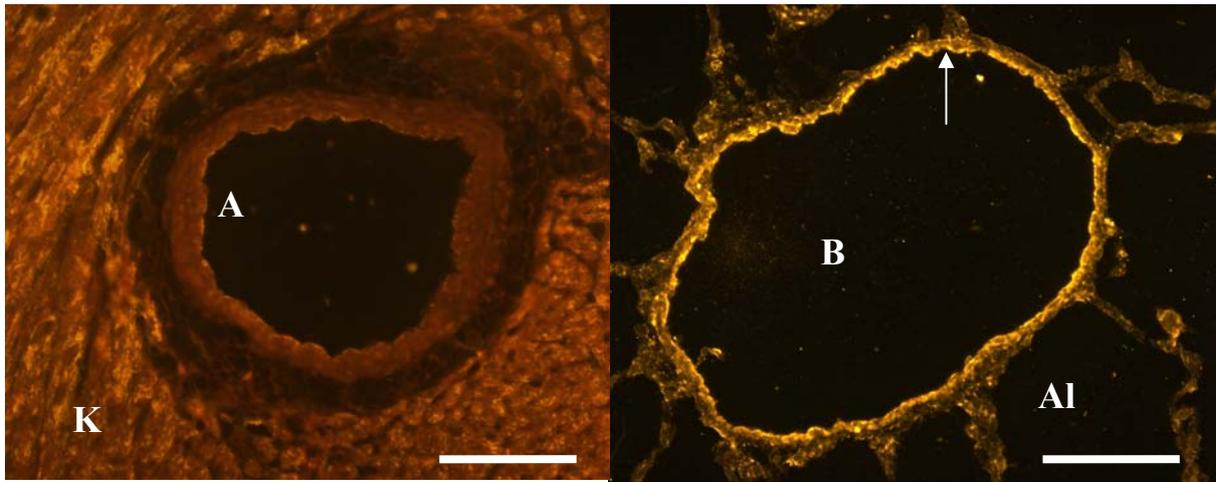
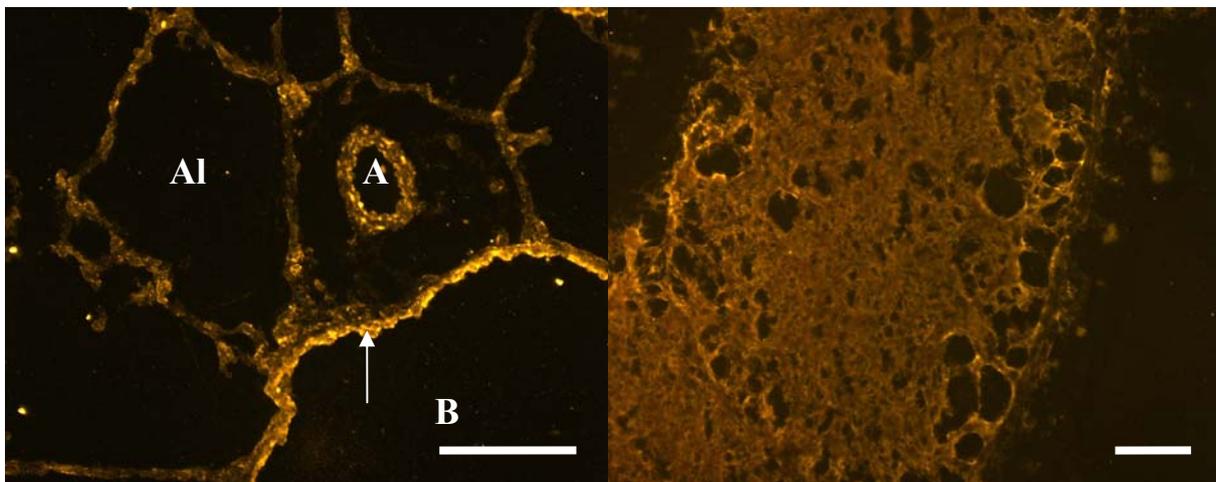


Abb. 13: AM des Antikörpers gegen die Complex V-subunit α : Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentilen 25 und 75 der Immunfluoreszenz der Herzmuskelzellen, der Koronargefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi, des Bronchialepithels, der Alveolarsepten und des plurivakuolären Fettgewebes sind in Boxplots dargestellt. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Test nach vorangegangenem Friedman-Test mit $p \leq 0,05$). \circ = Ausreißerwert. **a** = signifikant höhere Werte gegenüber allen anderen Geweben



Herzmuskel:
A = Arterie; K = Kardiomyozyt

Lunge:
Al = Alveole; B = Bronchus;
Pfeil = Bronchialepithel



Lunge:
A = Arterie; Al = Alveole;
B = Bronchus; Pfeil = Bronchialepithel

Plurivakuoläres Fettgewebe

Abb.14: Immunhistochemische Darstellung des Antikörpers gegen Complex V-subunit- α .
Maßstab (groß) = 50 μ m; Maßstab (klein) = 20 μ m

3.4 Histochemie

3.4.1 SDH-Aktivität (5 Minuten Inkubationszeit)

Herzmuskelzellen

Bei den Herzmuskelzellen zeigte sich eine sehr starke Markierungen mit typischer Querstreifung und Aussparung der Zellkerne (Abb. 16).

Koronargefäße

Die glatte Muskulatur zeigte eine leichte Markierung mit zarter, körniger Mitochondrienmarkierung, weiterhin wies das Gefäßendothel eine leichte Markierung auf (Abb. 16). Die AM entsprach ca. 33 % der der Herzmuskelzellen und der Unterschied erwies sich als hochsignifikant (Abb. 15). Sie unterschied sich nicht signifikant von der AM der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und der der Bronchi.

Lungengefäße

Es zeigte sich eine leichte, homogene Markierung der glatten Muskulatur ohne körnige Mitochondrienmarkierung sowie eine leichte Markierung des Gefäßendothels (Abb. 16). Der AM-Vergleich der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Koronargefäßen und der glatten Muskulatur der Bronchi, hingegen aber einen signifikanten Unterschied zu den Alveolarsepten. Die AM der glatten Muskulatur war höher als die der Alveolarsepten (Abb. 15).

Bronchialmuskulatur

Die Bronchialmuskulatur zeigte eine leichte, homogene Markierung der glatten Muskulatur ohne körnige Mitochondrienmarkierung (Abb. 16). Die AM der glatten Muskulatur der Bronchi wurde verglichen mit der AM der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße, den Koronargefäßen, den Alveolarsepten und dem Bronchialepithel. Die Ergebnisse der Vergleiche mit den Koronargefäßen und der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße wurde bereits oben beschrieben. Bei den Alveolarsepten und dem Bronchialepithel zeigte sich jeweils ein signifikanter Unterschied. Die Alveolarsepten hatten, wie auch bei den zuvor

beschriebenen Antikörpern, eine geringere AM, das Bronchialepithel dagegen zeigte eine höhere AM (Abb. 15).

Bronchialepithel

Zu erkennen war eine kräftige Markierung des gesamten Epithels ohne körnige Mitochondrienmarkierung und mit leichter homogener Zilienmarkierung (Abb. 16). Das Bronchialepithel zeigte gegenüber allen Geweben, ausgenommen das plurivakuolären Fettgewebe und den Herzmuskelzellen, eine höhere AM (Abb. 15).

Alveolen

Es zeigte sich eine leichte, homogene Markierung der Alveolarsepten mit kräftiger Markierung der Typ-II Zellen der Lunge. Eine körnige Mitochondrienmarkierung war nicht erkennbar (Abb. 16). Beim Vergleich der AM wiesen die Alveolarsepten gegenüber allen anderen Geweben eine signifikant schwächere Markierung auf (Abb. 15).

Plurivakuoläres Fettgewebe

Das plurivakuoläre Fettgewebe zeigte eine sehr starke Markierung mit Aussparung der Fetttropfen (Abb. 16). Die AM wurde verglichen mit der AM des Bronchialepithels. Sie wies eine signifikant höhere AM auf. Auch gegenüber den anderen Geweben, ausgenommen den Herzmuskelzellen, zeigte sich eine signifikant stärkere AM (Abb. 15).

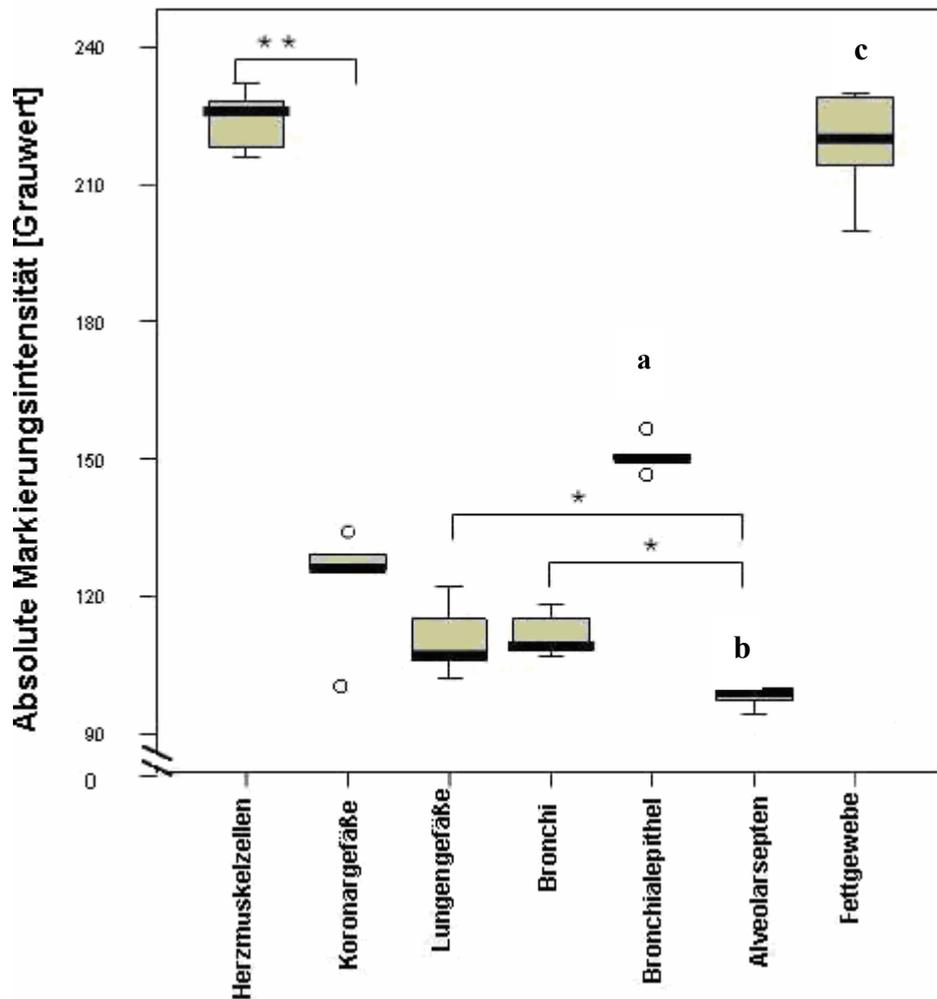
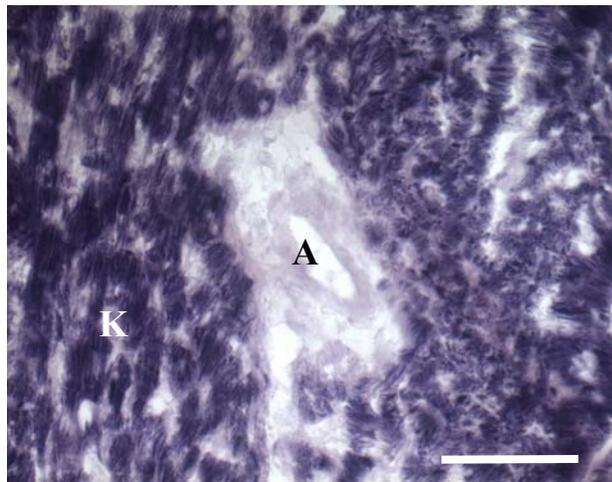


Abb. 15: AM der SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit): Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentilen 25 und 75 der Histochemie der Herzmuskelzellen, der Koronargefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi, des Bronchialepithels, der Alveolarsepten und des plurivakuolären Fettgewebes sind in Boxplots dargestellt. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Test nach vorangegangenem Friedman-Test mit $p \leq 0,05$). ** = $p < 0,01$. \circ = Ausreißerwert.

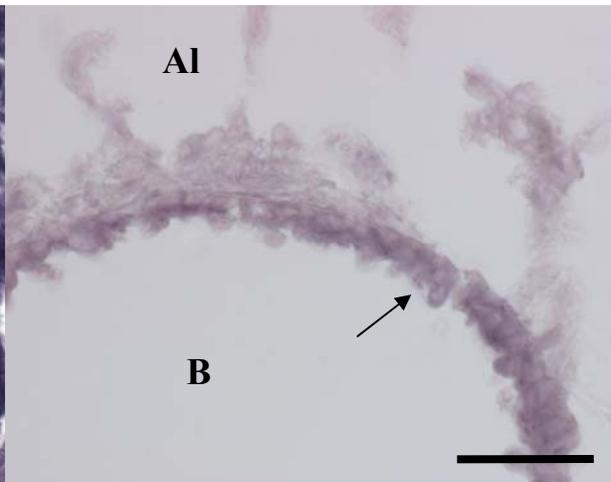
a = signifikant höhere Werte gegenüber allen Geweben ausgenommen das plurivakuoläre Fettgewebe und die Herzmuskelzellen

b = signifikant niedrigere Werte gegenüber allen anderen Geweben

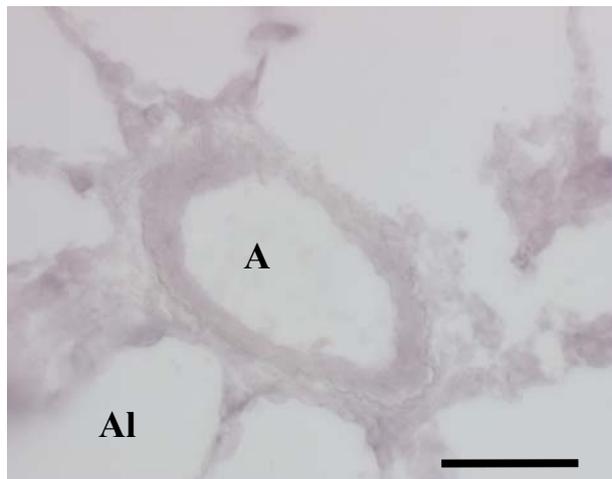
c = signifikant höhere Werte gegenüber allen Geweben ausgenommen der Herzmuskelzellen



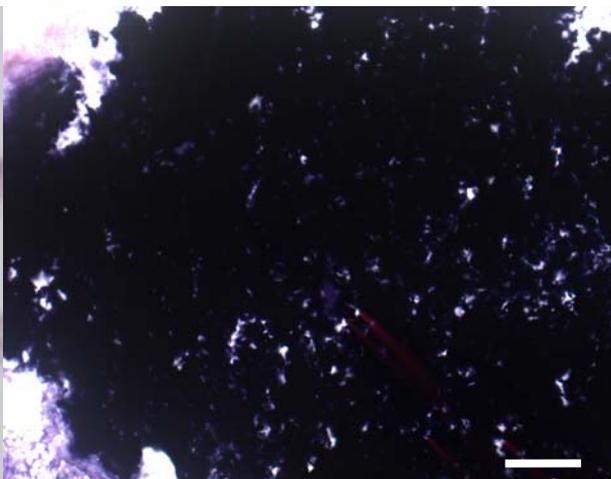
Herzmuskel:
A = Arterie; K = Kardiomyozyt



Lunge:
Al = Alveole; B = Bronchus;
Pfeil = Bronchialepithel



Lunge:
A = Arterie; Al = Alveole



Plurivakuoläres Fettgewebe

Abb.16: Histochemische Darstellung der SDH-Aktivität (5 Minuten Inkubationszeit).
Maßstab (groß) = 50 µm; Maßstab (klein) = 20 µm

3.4.2 SDH-Aktivität (40 Minuten Inkubationszeit)

Es zeigten sich die gleichen histochemischen Markierungen wie nach 5 Minuten Inkubationszeit, allerdings waren die Markierungen auf Grund der längeren Einwirkzeit allgemein etwas kräftiger (Abb. 16 und Abb. 18). Die Vergleiche der Intensität der SDH-Aktivität der Gewebe zeigte bis auf wenige Ausnahmen dieselben Ergebnisse wie nach 5 Minuten Inkubationszeit. Die Unterschiede sind nachfolgend aufgeführt.

Der Vergleich der Koronargefäße mit der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und den Bronchi ließ hier eine signifikant höhere AM der Koronargefäße erkennen.

Durch die große Streuung der Messwerte des Bronchialepithels zeigte sich beim Vergleich der AM mit der der Alveolarsepten und der AM der glatten Muskulatur der Bronchi keine Signifikanz, obwohl in der mikroskopischen Betrachtung häufig eine stärkere Markierung des Bronchialepithels auffiel (Abb. 17).

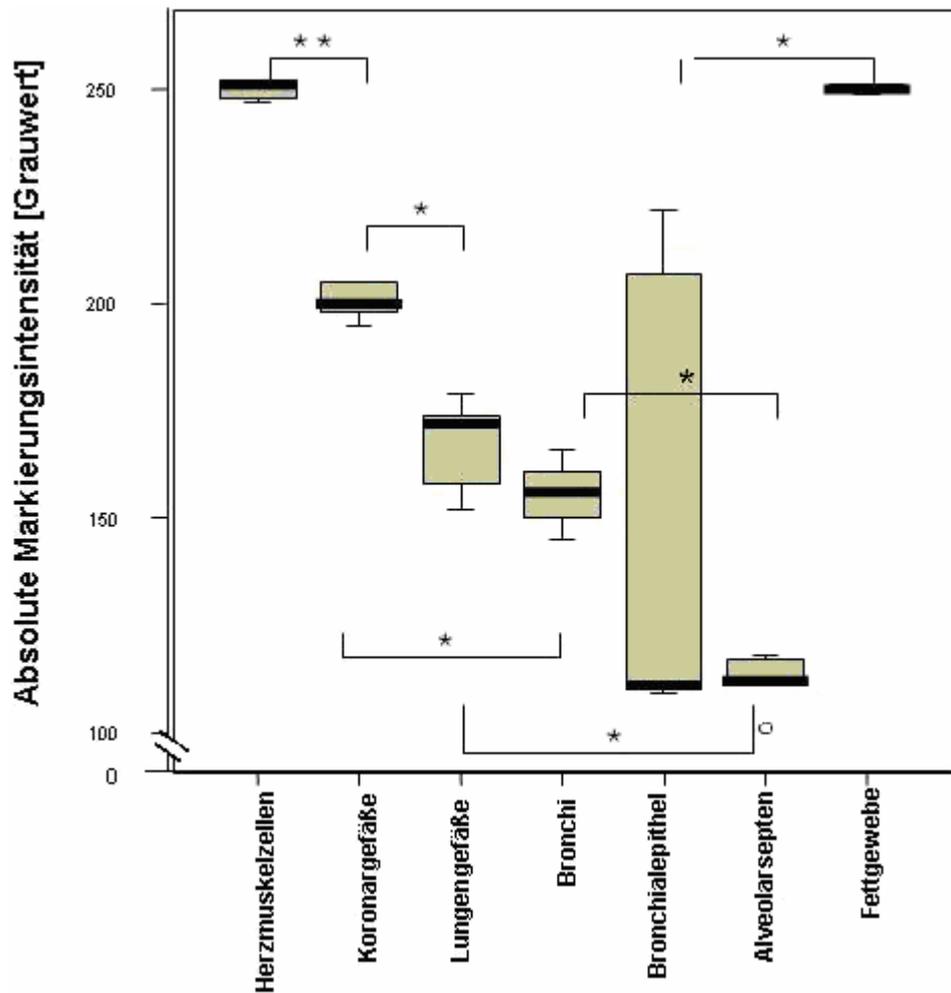
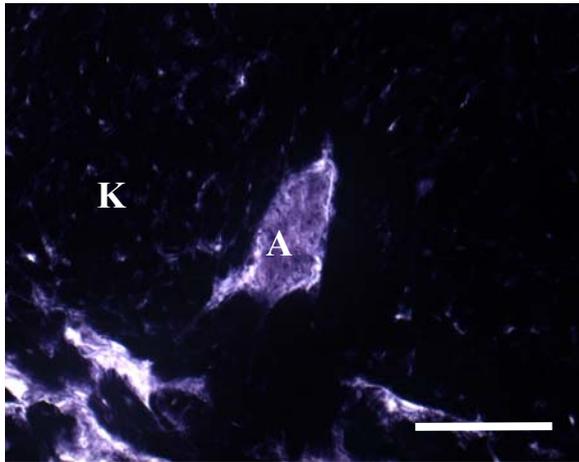
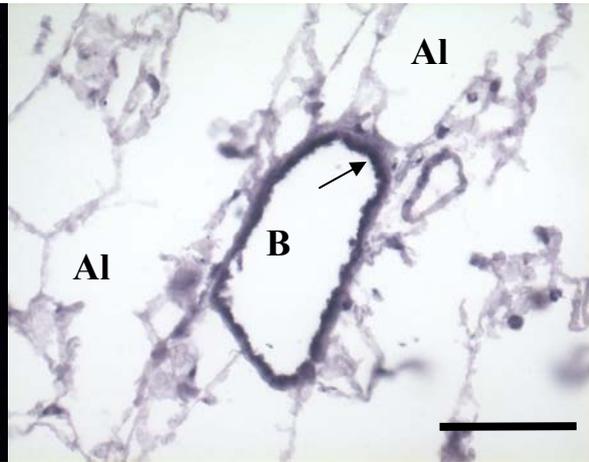


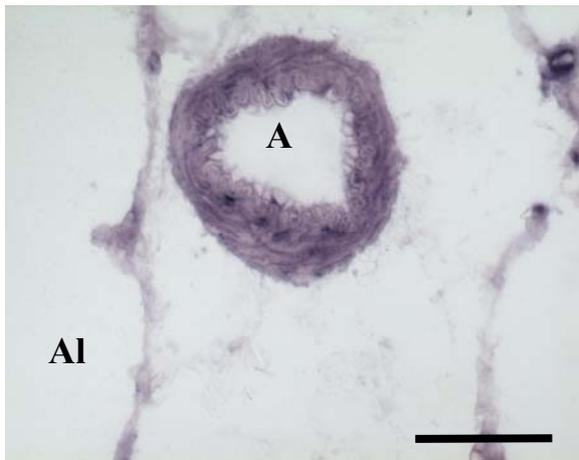
Abb. 17: AM der SDH-Histochemie (40 min Inkubationszeit): Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die Perzentilen 25 und 75 der Histochemie der Herzmuskelzellen, der Koronargefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße, der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi, des Bronchialepithels, der Alveolarsepten und des plurivakuolären Fettgewebes sind in Boxplots dargestellt. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Test nach vorangegangenem Friedman-Test mit $p \leq 0,05$). ** = $p < 0,01$. ○ = Ausreißerwert.



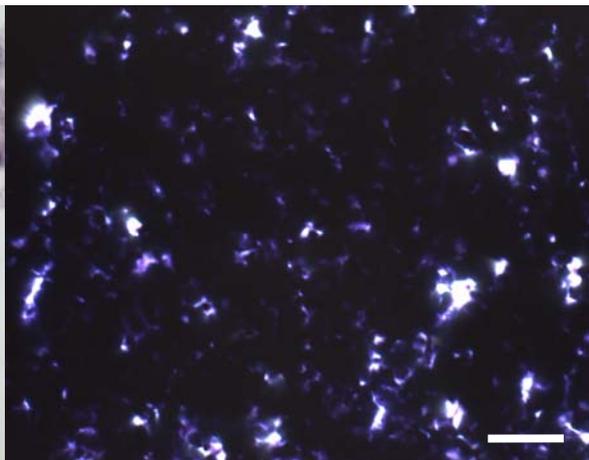
Herzmuskel:
A = Arterie; K = Kardiomyozyt



Lunge:
Al = Alveolen; B = Bronchus;
Pfeil = Bronchialepithel



Lunge:
A = Arterie; Al = Alveole



Plurivakuoläres Fettgewebe

Abb. 18: Histochemische Darstellung der SDH-Aktivität (40 Minuten Inkubationszeit).
Maßstab (groß) = 50 µm; Maßstab (klein) = 20 µm

3.5 Vergleich der immunhistochemischen und histochemischen Markierungsintensitäten innerhalb der Gewebeanteile

Die Markierungsintensität der Herzmuskelzellen wurde als Eichwert auf 100% gesetzt und für die anderen Gewebe der prozentuale Wert in Bezug auf die Herzmuskelzellen errechnet. Dieser Wert wurde als relative gewebsspezifische Markierungsintensität (RGM) bezeichnet.

3.5.1 Koronargefäße

Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den RGM-Werten für SDHA, SDHB (monoklonal), SDHB (polyklonal) und SDHC zu beobachten. Die RGM für Komplex V-subunit- α war signifikant schwächer als die für SDHA, SDHB (monoklonal), SDHB (polyklonal) sowie als die RGM der histochemischen Darstellung der SDH-Aktivität nach beiden Inkubationszeiten. Lediglich bei der RGM für SDHC war kein signifikanter Unterschied zu der RGM für die Complex V subunit- α zu erkennen. Die RGM der SDH-Aktivität (5 min Inkubationszeit) zeigte im Vergleich mit der RGM der SDH-Untereinheiten, ausgenommen SDHC, keine signifikanten Unterschiede. Beim Vergleich mit der RGM der Complex V subunit- α zeigte die SDH-Aktivität (5 min Inkubationszeit) eine signifikant stärkere RGM. Die SDH-Aktivität (40 min Inkubationszeit) zeigte eine hochsignifikant stärkere Markierungsintensität als alle SDH-Antikörper, als der Complex V-Antikörper und die SDH-Aktivität (5 min Inkubationszeit) (Abb. 19).

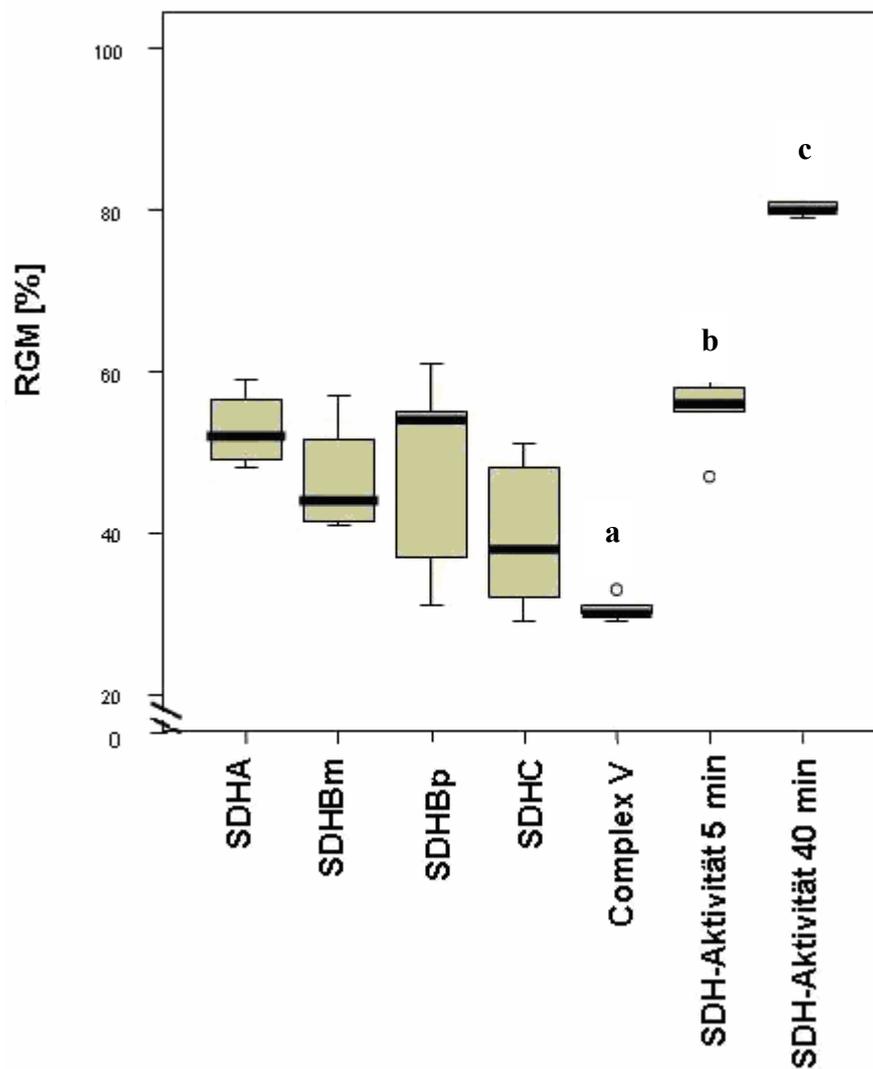


Abb. 19: RGM für Koronargefäße: Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentilen sind dargestellt. \circ = Ausreißerwert. SDHBp = SDHB polyklonal, SDHBm = SDHB monoklonal
a = hochsignifikant ($p \leq 0,01$) different zu allen Gruppen außer SDHC
b = hochsignifikant höher als Complex V und SDHC
c = hochsignifikant different zu allen Gruppen

3.5.2 Glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße

Die RGM für SDHA unterschied sich nicht signifikant von der RGM der anderen Antikörper und auch nicht von der SDH-Histochemie. Die RGM für Complex V-subunit- α war signifikant höher als die der SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit). Ebenfalls unterschied sich die RGM für die SDH-Histochemie (40 min Inkubationszeit) von der des SDHB-

Antikörpers (monoklonal) und des Complex V- subunit- α sowie von der SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit) (Abb. 20).

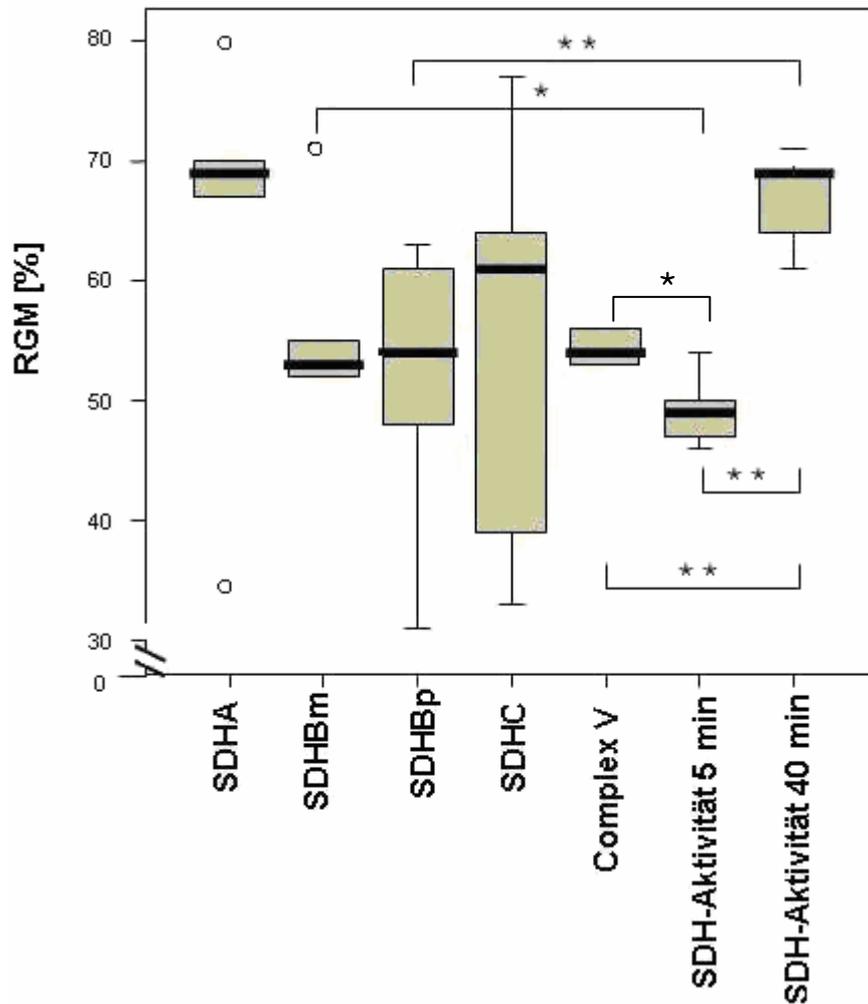


Abb. 20: RGM für die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße: Die Minimum-, Maximum- und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentilen sind dargestellt. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, \circ = Ausreißerwert. SDHBp = SDHB polyklonal, SDHBm = SDHB monoklonal

3.5.3 Glatte Muskulatur der Bronchi

Die SDH-Untereinheiten zeigten in der RGM keinen signifikanten Unterschied untereinander. SDHB (monoklonal) unterschied sich jedoch signifikant von der Complex V-subunit- α sowie von der SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit). Sie zeigte eine deutlich höhere RGM. Die RGM für Complex V-subunit- α war signifikant schwächer als die für SDHB (monoklonal),

und als die RGM für die histochemische Darstellung der SDH-Aktivität (40 min Inkubationszeit), jedoch nicht schwächer als die SDH-Aktivität (5 min Inkubationszeit), SDHA, SDHC und SDHB (polyklonal). Die RGM für die SDH-Aktivität (5 min Inkubationszeit) und der SDH-Aktivität (40 min Inkubationszeit) unterschieden sich untereinander und, wie oben bereits erwähnt, von der SDHB (monoklonal) (Abb. 21).

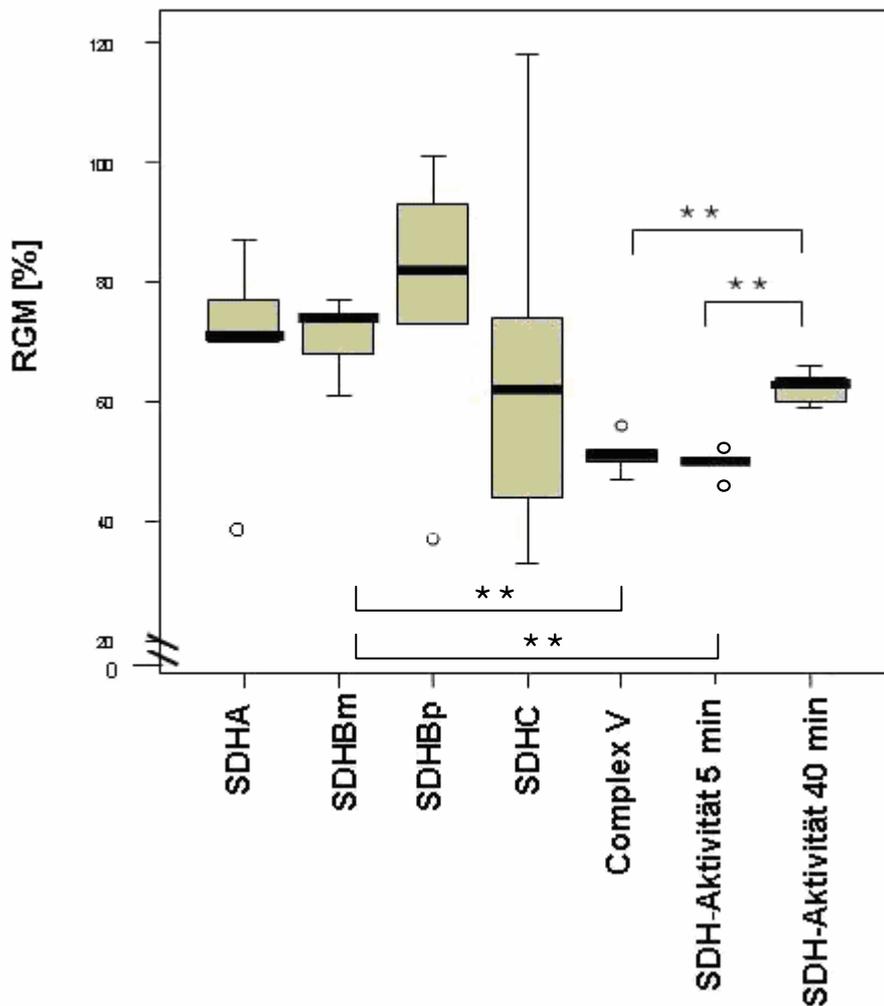


Abb. 21: RGM für die glatte Muskulatur der Bronchi: Die Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentilen sind dargestellt. ** = $p \leq 0,01$, \circ = Ausreißerwert. SDHBp = SDHB polyklonal, SDHBm = SDHB monoklonal

3.5.4 Bronchialepithel

Die RGM-Werte für SDHA, SDHB (monoklonal), SDHB (polyklonal) und SDHC wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf. Mit Ausnahme von SDHB (monoklonal) unterschieden sie sich jedoch hochsignifikant von der SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit) und zeigten eine deutlich stärkere RGM als diese. Auch die RGM der Complex V-subunit- α war hochsignifikant stärker als die der SDH-Histochemie. Zudem unterschied sich SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit) signifikant von der SDH-Histochemie (40 min Inkubationszeit). SDH-Histochemie (40 min Inkubationszeit) zeigte eine höhere RGM als die SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit) (Abb. 22).

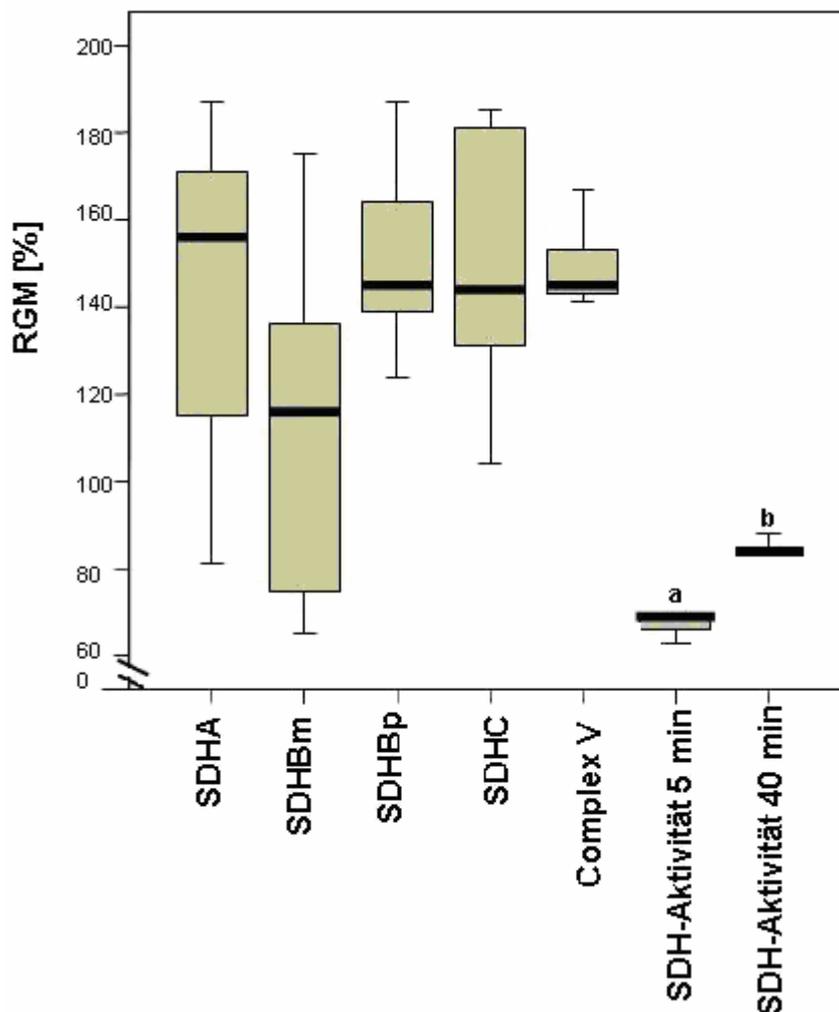


Abb. 22: RGM für das Bronchialepithel: Die Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentilen sind dargestellt. \circ = Ausreißerwert. SDHBp = SDHB polyklonal, SDHBm = SDHB monoklonal
a = hochsignifikant ($p \leq 0,01$) different zu allen anderen Werten außer SDHBm
b = hochsignifikant niedriger als SDHBp, SDHC und Complex V

3.5.5 Alveolarepithel

Bei den Alveolarepithel zeigte sich, ähnlich wie beim Bronchialepithel, kein signifikanter Unterschied der RGM bei den Untereinheiten SDHA, SDHB (monoklonal), SDHB (polyklonal), SDHC und Complex V-subunit- α . Die SDH-Histochemie zeigte eine signifikant höhere RGM gegenüber den SDH-Antikörpern, ausgenommen SDHB-Antikörper (polyklonal), und gegenüber der Complex V-subunit- α . Die RGM-Werte der SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit) und SDH-Histochemie (40 min Inkubationszeit) unterschieden sich nicht voneinander (Abb. 23).

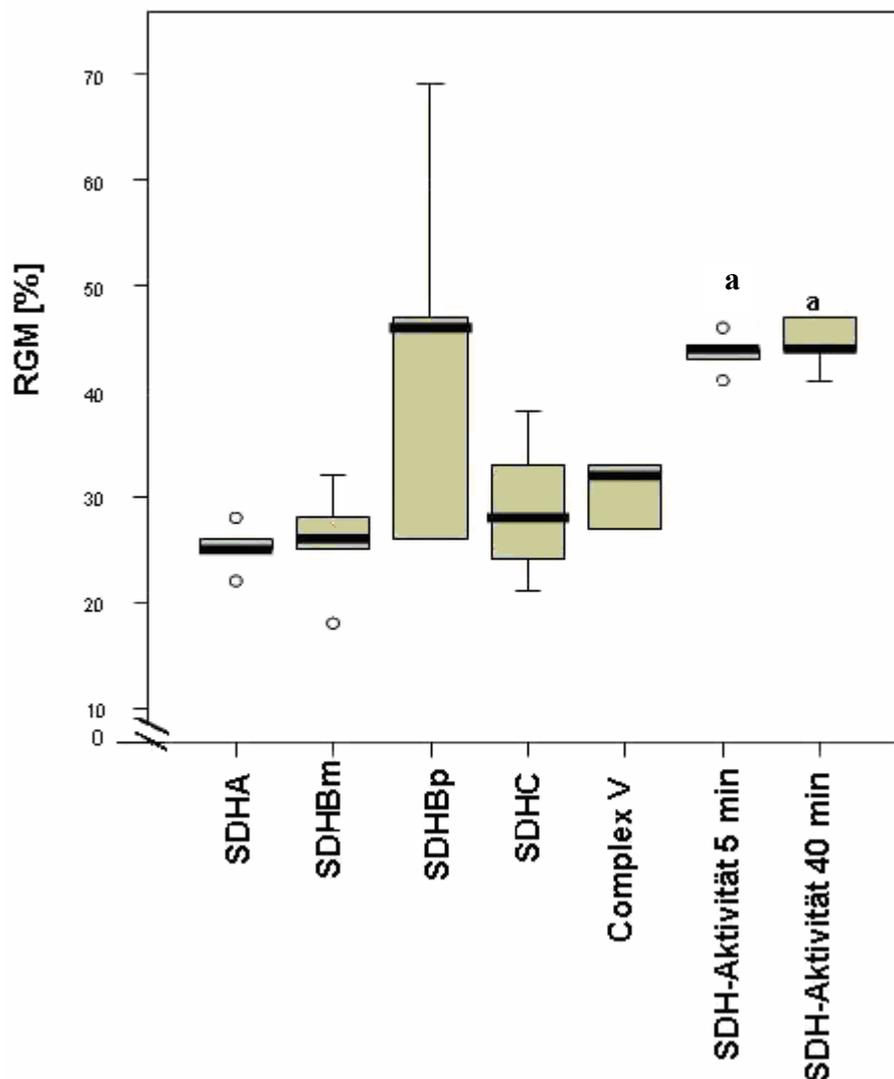


Abb. 23: RGM für die Alveolarepithel: Die Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentilen sind dargestellt. \circ = Ausreißerwert. SDHBp = SDHB polyklonal, SDHBm = SDHB monoklonal
a = hochsignifikant ($p \leq 0,01$) different zu SDHA, SDHBm, SDHC und Complex V

3.5.6 Plurivakuoläres Fettgewebe

Zwischen den SDH-Antikörpern zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den RGM-Werten. Sie wiesen aber alle eine signifikant höhere RGM als Complex V-subunit- α auf. Gegenüber der SDH-Histochemie zeigten der SDHA- und der SDHC-Antikörper signifikante Unterschiede. Die Complex V-subunit- α unterschied sich hochsignifikant in den RGM-Werten gegenüber allen SDH-Untereinheiten und der SDH-Histochemie; ihre RGM war wesentlich schwächer. Die SDH-Histochemie (5 min Inkubationszeit) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der SDH-Histochemie (40 min Inkubationszeit), jedoch zur Complex V-subunit- α , deren RGM deutlich schwächer war (Abb. 24).

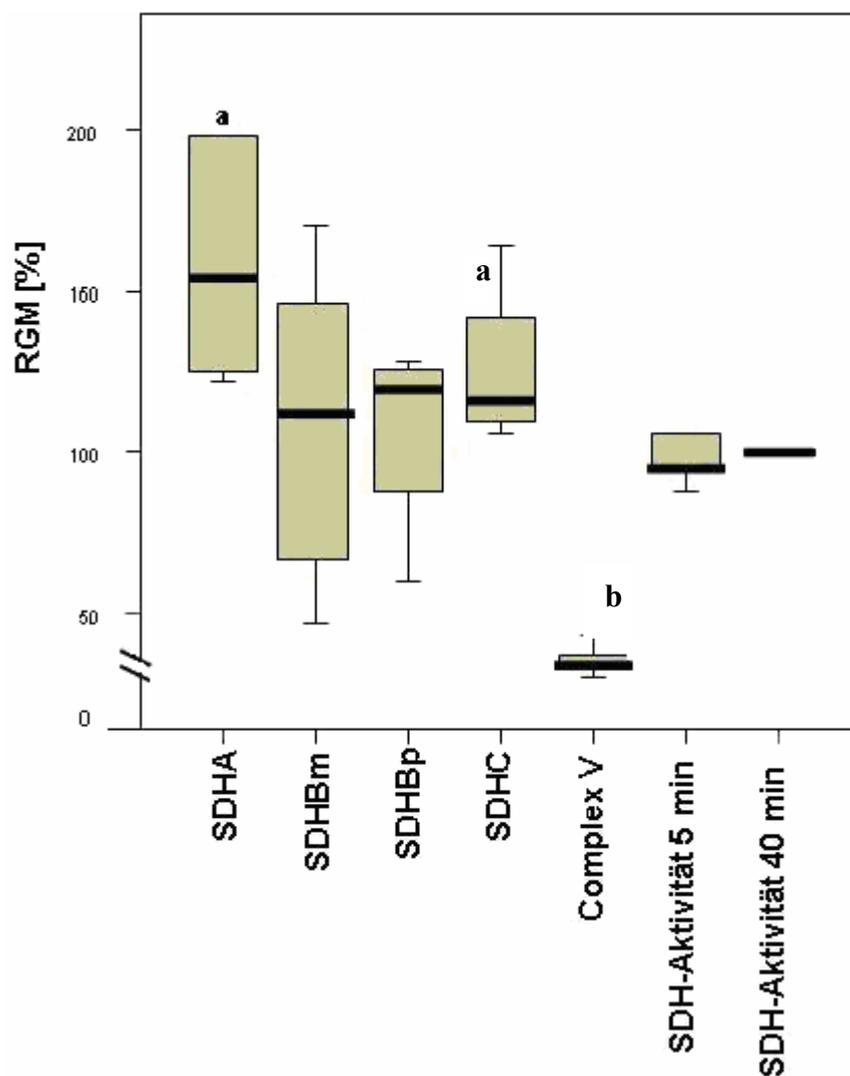


Abb. 24: RGM für das plurivakuoläre Fettgewebe: Die Minimum-, Maximum-, und Medianwerte sowie die 25 und 75 Perzentilen sind dargestellt. \circ = Ausreißerwert. SDHBp = SDHB polyklonal, SDHBm = SDHB monoklonal

a = signifikant ($p \leq 0,05$) different zur SDH-Histochemie

b = hochsignifikant ($p \leq 0,01$) different zu allen anderen Werten

4. Diskussion

Die Mechanismen der zellulären Sauerstoffmessung sind noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden mehrere mögliche Sauerstoffsensormodelle, zu denen auch das Mitochondrienmodell gehört. Unter Hypoxie kommt es zu einem Anstieg der ROS-Produktion innerhalb des Mitochondriums (Hoppeler et al. 2003, Giaccia et al. 2004, Bell et al. 2005). ROS gelten als second messenger, die über einen Signalweg die Aktivierung des HIF-1 α einleiten (Gregory et al. 1999, Hoppeler et al. 2003). Diese Erkenntnis führte zu der Hypothese, dass die Mitochondrien in den Signalweg der Sauerstoffmessung involviert sind. Von besonderem Interesse sind dabei die Komplexe I, II und III der Atmungskette, die als Hauptquelle der ROS-Produktion im Mitochondrium gelten (Leach et al. 2001, Paddenberg et al. 2003, Chen et al. 2003, Giaccia et al. 2004, Acker&Acker 2004).

Thema dieser Arbeit ist der Komplex II, auch Succinatdehydrogenase genannt. Die Succinatdehydrogenase katalysiert im Mitochondrium als Teil des Zitratzykluses die Oxidation von Succinat zu Fumarat und überträgt in der Atmungskette zwei Elektronen auf Ubiquinon. Diskutiert wird der Komplex II außerdem (wie oben bereits erwähnt) als eine Quelle der ROS-Produktion und somit als Teil des Signalwegs der Sauerstoffmessung.

Geht man davon aus, dass die SDH an der Sauerstoffmessung beteiligt ist, sollte sie auch in jeder Zelle vertreten sein. Es konnten jedoch schon Szentagothai (1957) und Hajos & Kerpel-Fronius (1971) zeigen, dass in den Mitochondrien der axonalen Endigungen von Nervenzellen keine SDH-Aktivität vorhanden ist.

Es bleibt daher zu klären, welche Zellen SDH enthalten und welche mit Mitochondrien ohne SDH ihren Stoffwechsel bestreiten. In dieser Arbeit wurden Zellen von Herz und Lunge sowie plurivakuoläres Fett auf das Vorhandensein von SDH untersucht.

4.1 Verteilung der SDH in Herz und Lunge

Um die SDH nachzuweisen zu können, wurden immunhistochemische (Immunfluoreszenz) und histochemische Untersuchungsmethoden angewandt.

Für die immunhistochemische Darstellung der SDH wurden eigens Antikörper gegen die Untereinheiten (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) durch Immunisierung von Kaninchen und Meerschweinchen hergestellt. Die gewonnenen Antikörper wurden mittels immunhistochemischer Präabsorptionstests und Western blot auf ihre Spezifität getestet.

Dabei zeigte sich, dass der SDHD-Antikörper keine Spezifität zu dem Antigen aufwies und daher für die weiteren Untersuchungen nicht genutzt wurde. Da die Untereinheit D der SDH als kleinste Untereinheit aus 104 AS besteht, war die Auswahl an Peptidpitopen zur Immunisierung begrenzt und die ausgewählte Sequenz zeigte möglicherweise zu viele Sequenzhomologien, um eine spezifische Immunreaktion bei den geimpften Tieren hervorzurufen.

Für eine optimale immunhistochemische Darstellung wurde das Protokoll für bereits vorhandene monoklonale Antikörper gegen die Untereinheiten A und B verfeinert und auf die hergestellten polyklonalen Antikörper abgestimmt.

Für die histochemische Darstellung wurde das Protokoll von Kerpel-Fronius und Hajos (1968) modifiziert (siehe Material und Methoden) und Inkubationszeiten von 5 min und 40 min verwendet. Die Kombination dieser beiden Untersuchungsmethoden ermöglicht neben der Differenzierung in Enzymmenge und Aktivität des Enzyms auch eine gegenseitige Kontrolle, was sehr gut am Beispiel der Muskulatur der kleinen Lungengefäße zu sehen ist. Die SDH-Histochemie zeigte dort eine sehr zarte Färbung, die durchaus Artefakt bedingt sein könnte, die Immunhistochemie zeigte jedoch, dass dort SDH vorhanden ist und die leichte Färbung als eine sehr geringe Aktivität zu deuten ist.

Im Herzen wurde die quantitative SDH-Immunhistochemie am gesamten Gewebeschnitt durchgeführt, ausgewertet wurden aber nur die Koronargefäßen und die Herzmuskelzellen. Bei der Auswertung wurde auf eine intrazelluläre, granuläre, fadenförmige Markierung geachtet, wie sie auch im Vergleich mit Antikörpern gegen ein bekanntes Mitochondrienantigen (mitochondriale ATP-Synthase) beobachtet werden konnte.

Die Koronargefäße zeigten, wie auch die Herzmuskelzellen, bei allen getesteten Antikörpern eine Markierung. Velez et al. (1985) nutzen bereits Antikörper gegen SDH um in Mitochondrien isoliert aus Rattenherzen das Enzym im Zuge einer Aktivitätsmessung zu blocken. Löffler et al. (1996) wiesen SDH in Herzmuskelzellen von Rindern mittels Amperometrie und Photometrie nach. Eine von Murray et al. 2004 durchgeführte Elektrophorese sowie ein Western blot an aus Herzmuskelzellen isolierten Mitochondrien inkubiert mit Antikörpern gegen die SDH-Untereinheiten A und B, wiesen ebenfalls das Vorhandensein der SDH nach.

Auch histochemisch ließ sich eine SDH-Aktivität nachweisen, sowohl bei 5 min als auch bei 40 min Inkubationszeit. Nakatini et al. (1999) und des Tombe et al. (2002) fanden ebenfalls in Herzmuskelzellen eine SDH-Aktivität.

In den Lungenschnitten wurden die glatten Muskelzellen der kleinen Lungengefäße (<100 µm) und der kleinen Bronchi sowie das Bronchialepithel und die Alveolarsepten ausgewertet. Die Immunfluoreszenz zeigte eine deutliche Markierung in allen geprüften Geweben.

Bei der histochemischen Untersuchung war in allen Geweben eine SDH-Aktivität nachweisbar.

Thaete & Malkinson führten bereits 1990 eine histochemische Untersuchung der SDH-Aktivität an der Lunge von Mäusen durch. Sie untersuchten neben Typ II-Zellen und Clara-Zellen auch das Bronchialepithel und die Alveolarsepten von erwachsenen, heranwachsenden und fetalen Mäusen. Die Typ II-Zellen und Clara-Zellen, wie auch das Bronchialepithel, zeigten dabei eine SDH-Aktivität, die Alveolarsepten dagegen nur bei fetalen Mäusen und innerhalb der ersten beiden Lebenswochen. Mit dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass auch in Alveolarsepten von erwachsenen Tieren eine SDH-Aktivität vorhanden ist, wenn auch nicht so stark wie z.B. im Bronchialepithel. Unterstützend dazu kommt, dass die Immunhistochemie ebenfalls die SDH-Untereinheiten A, B und C nachwies. Die von mir untersuchten Lungen stammten zwar von erwachsenen Ratten, in der Austestungsphase der Antikörper wurde jedoch auch Mausgewebe benutzt, welches im Markierungsverhalten keinen Unterschied zum Rattengewebe zeigte.

Möglicherweise kommt es auf Grund der unterschiedlichen Menge des eingesetzten Succinats für die Histochemie zu diesem Unterschied in der Aktivitätsbestimmung. Thaete & Malkinson nutzten für ihre Versuche 30 mM Succinatlösung, in dieser Arbeit wurde mit 200 mM gearbeitet. Da die Alveolarsepten im Gegensatz zu dem Bronchialepithel eine sehr schwache SDH-Aktivität zeigten, war möglicherweise die Succinatmenge nicht ausreichend, oder aber die schwache Aktivität wurde nicht als solche erkannt.

Des Weiteren wurde neben den bereits erwähnten Geweben noch plurivakuoläres Fettgewebe immunhistochemisch und histochemisch untersucht, welches jeweils eine starke Fluoreszenzmarkierung und eine deutliche histochemische Markierung aufwies.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Gewebe und Zelltypen von Herz und Lunge SDH enthalten.

4.2 Quantitativer Vergleich der SDH-Untereinheiten innerhalb eines Gewebes

Um sich einen Überblick über die Verteilung der einzelnen Untereinheiten innerhalb eines Gewebes zu schaffen, wurden die Untereinheiten miteinander verglichen. Da das Enzym bei Säugetieren aus einer festen Anzahl von Untereinheiten (A,B,C und D) zusammengesetzt ist, die koreguliert sind (Hägerhäll 1997, Sun et al. 2005), sollte die Untereinheitenverteilung innerhalb eines Gewebes annähernd gleich sein. Dies wurde geprüft mit den polyklonalen Antikörpern gegen die Untereinheiten A, B und C sowie dem monoklonalen Antikörper gegen SDHB. Um die Antikörper untereinander vergleichen zu können, wurde die Markierungsintensität der Herzmuskelzellen als Eichwert auf 100% gesetzt und für die anderen Gewebe der prozentuale Wert in Bezug auf die Herzmuskelzellen errechnet. Diese wurden als Standard gewählt, da bereits andere unabhängige Studien das Vorhandensein der SDH mittels Immunhistochemie und Histochemie an Herzmuskelzellen (Nakatani et al. 1999, des Tombe et al. 2002) sowie Elektrophorese und Western blot an aus Herzmuskelzellen isolierten Mitochondrien zeigen konnten (Murray et al. 2004).

In den Herzmuskelzellen, den Koronargefäßen, den Alveolarsepten, in der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und der Bronchi, im Bronchialepithel sowie im plurivakuolären Fettgewebe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Untereinheitenverteilung. Auch der monoklonale Antikörper gegen die Untereinheit B der SDH zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit dem polyklonalen. Die Untereinheitenverteilung innerhalb eines Gewebes ist somit annähernd gleich.

Paddenberg et al. (2006) konnten durch Inhibition der SDHA mit dem speziellen Inhibitor 3-NPA die HPV der intra-aziniären Arterien blocken. Ebenso gelang dies mit dem Flavoproteininhibitor DPI, der unter den SDH-Untereinheiten selektiv die flavoproteinenthaltende SDHA blockiert. Der Komplex II Inhibitor TTFA, der selektiv die Ubiquinonbindungsstelle blockiert, war nicht so effektiv in der Enzyminhibition.

Denkbar wäre eine zusätzliche Aufgabe der Untereinheit A in der Sauerstoffmessung der Zelle mit einer entscheidenden Rolle in der Vermittlung der HPV. Sollte die SDHA eine weitere Rolle im Stoffwechsel spielen, müsste sie entweder mengenmäßig stärker vertreten sein als die anderen Untereinheiten, oder aber besondere Eigenschaften haben; möglich wären z.B. Isoformen der Untereinheit. Mit dieser Arbeit lässt sich zeigen, dass unter Normoxie die Untereinheit A der SDH mengenmäßig in der Muskulatur der kleinen Lungengefäße (<100 µm) nicht stärker vertreten ist als die anderen Untereinheiten.

4.3 Quantitative Unterschiede im SDH-Gehalt der untersuchten Gewebe

Die untersuchten Untereinheiten sowie Komplex V zeigten alle in den untersuchten Geweben ähnliche Verteilungsmuster. Die stärksten Markierungen ohne signifikanten Unterschied zueinander zeigten jeweils das Fettgewebe und das Bronchialepithel. Am schwächsten wurden die Alveolarsepten markiert. Die Herzmuskelzellen zeigten eine signifikant stärkere Markierung als die Koronargefäße und die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße sowie der Bronchi. Die glatte Muskulatur der kleinen Lungengefäße und der Bronchi unterschieden sich signifikant voneinander lediglich bei der SDHA und SDHB. Die Koronargefäße unterschieden sich nur bei der SDHC von der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße und bei der SDHB (polyklonal) von der glatten Muskulatur der Bronchi. Bei den anderen Untereinheiten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu der glatten Muskulatur. Die unterschiedliche Markierungsintensität der einzelnen Gewebe kommt wahrscheinlich durch den unterschiedlichen Mitochondriengehalt der Gewebe zu Stande.

Stoffwechselaktive Gewebe mit hohem ATP-Umsatz wie die Herzmuskelzellen, das plurivakuoläre Fettgewebe und das sich ständig erneuernde Bronchialepithel zeigten einen höheren Gehalt an SDH als Gewebe mit einer niedrigeren Stoffwechselleistung, da sie wahrscheinlich eine höhere Mitochondriendichte haben. Benard et al. (2006) verglichen den Mitochondriengehalt im Herzmuskel, in Skelettmuskelzellen, im Gehirn, in der Leber und in der Niere von Ratten durch Messung der Aktivität der Citratsynthase im jeweiligen Gewebelysat. Dabei wiesen die Herzmuskelzellen den höchsten Mitochondriengehalt auf, gefolgt von den Muskelzellen und den Gehirnzellen; Leber und Niere dagegen zeigten nur ca. 1/7 der Mitochondrienmenge der Herzmuskelzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Antikörper gegen Komplex V der Atmungskette als Mitochondrienmarkierung zur Bestimmung der Mitochondrienmenge eingesetzt.

Um eine Aussage bezüglich der Verteilung der einzelnen Untereinheiten treffen zu können, wurden diese innerhalb eines Gewebes miteinander verglichen.

4.4 Quantitativer Vergleich des immunhistochemisch darstellbaren Gehalts an SDH-Untereinheiten mit dem des Komplex V

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen mit den Antikörpern gegen die SDH-Untereinheiten zeigten die Gewebe einen unterschiedlichen Gehalt an SDH. Um die Frage zu klären, ob diese Unterschiede des SDH-Gehalts aus unterschiedlichen Mitochondrienmenge resultieren, oder ob die Zellen Mitochondrien ohne SDH enthalten, wurde außerdem der Komplex V als Mitochondrienmarker immunhistochemisch bestimmt.

Komplex V, oder ATP-Synthase genannt, katalysiert den letzten Schritt der Energiegewinnung der Zelle, nämlich die Phosphorylierung von ADP zu ATP. Sie ist somit essenziell für die Energiegewinnung über die Atmungskette. Als Ausnahme gilt das braune plurivakuoläre Fettgewebe, das nur sehr geringe Mengen an Komplex V enthält und primär Energie in Form von Wärme produziert. Im braunen Fettgewebe wird die Energie des Protonengradienten nicht für die ATP-Synthese genutzt, sondern durch die Entkopplung des Protonenfluxes von der ATP-Synthase durch das Protein UCP1 (uncoupling protein) in Wärme umgewandelt. UCP1 bewirkt einen Rückfluss der Protonen in die Matrix und die im Protonengradienten gespeicherte Energie wird als Wärme freigesetzt (Boss et al. 2000, Jezek et al. 2004). Dadurch, dass das braune Fettgewebe zwar Mitochondrien enthält, aber kaum Komplex V, müsste der Antikörper gegen Komplex V kaum Markierungen hervorrufen, in anderen Geweben dagegen schon. Der Komplex V-Antikörper wird somit als Mitochondrienmarkierung zur Bestimmung der Mitochondrienmenge eingesetzt und anhand der Markierung kann dann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die SDH-Menge mit der Mitochondrienmenge bzw. der des Komplex V als Teil der Atmungskette übereinstimmt.

Szentagothai (1957) und Hajos & Kerpel-Fronius (1971) zeigten bereits, dass in den Mitochondrien der axonalen Endigungen von Nervenzellen keine SDH-Aktivität vorhanden ist. Dementsprechend könnten auch andere Zellen Mitochondrien ohne SDH enthalten und deren Atmungskette hauptsächlich mit den Komplexen I, III und IV agieren. Um herauszufinden, ob dies auch für die genutzten Gewebe zutreffen könnte, wurde die immunhistochemische Markierung der SDH-Untereinheiten mit der des Komplex V-Antikörpers verglichen. Als Referenzwert wurden auch hier die Herzmuskelzellen gewählt.

Innerhalb der einzelnen Gewebe zeigte der Komplex V ein ähnliches Verteilungsmuster wie die SDH, ausgenommen das plurivakuoläre Fettgewebe. Dort zeigte sich eine sehr schwache Markierungsintensität ähnlich der der Alveolarsepten. Da braunes Fett Komplex V enthält, wenn auch nur in sehr geringem Maß (Jezek et al. 2004), ist dieses Ergebnis schlüssig.

Für die einzelnen Gewebe wurde dann der SDH-Gehalt mit dem Komplex V-Gehalt verglichen.

In den Koronargefäßen zeigten sich signifikant niedrigere Werte des Komplex V im Vergleich mit denen der SDHA und SDHB (monoklonal), nicht jedoch mit denen der SDHC und der SDHB (polyklonal). In der glatten Muskulatur der Bronchi zeigte sich eine signifikant stärkere Markierung der Untereinheit B (polyklonal) gegenüber der des Komplexes V. Die RGM der SDH-Untereinheiten der Alveolarsepten, des Bronchialepithels und die der glatten Muskulatur der Lungengefäße zeigten keinen Unterschied zum Komplex V. Dies spricht dafür, dass deren Mitochondrien SDH enthalten. Das plurivakuoläre Fettgewebe wies, wie vorher gesagt, eine extrem niedrige Komplex V-Markierung auf. Der Mitochondriengehalt übersteigt somit nicht den SDH-Gehalt, was dafür spricht, dass in den Mitochondrien der untersuchten Gewebe SDH enthalten ist. Die gewebespezifischen Unterschiede in den RGM-Relationen der einzelnen SDH-Untereinheiten im Vergleich zu Complex V sprechen für zelltypspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe.

Gegen die Nutzung des Komplex-V-Antikörpers als Mitochondrienmarkierung zur Bestimmung der Mitochondrienmenge spricht eine Arbeit von Schägger und Pfeifer (2001). Diese bestimmten in Mitochondrien aus Rinderherzen das Verhältnis der Atmungskettenkomplexe zueinander. Die Komplexe verhielten sich untereinander 1.1:1.3:3:6.7:3.5. Da Komplex V und SDH im Verhältnis 3.5:1.3 zueinander stehen, könnte man mit dem Vergleich der SDH mit Komplex V keine Aussage über den möglichen SDH-Gehalt eines Mitochondriums machen, zumindest nicht für die Herzmuskelzellen und die Koronargefäße. Benard et al. (2006) fanden dagegen ein anderes Verhältnis der Atmungskettenkomplexe zueinander in Mitochondrien isoliert aus Herzen, aus Skelettmuskelzellen, aus dem Gehirn, aus der Leber und aus der Niere von Ratten (1-1.5:30-135:3:9-35:6,5-7,5). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass in verschiedenen Geweben nicht nur unterschiedliche Mengen an Mitochondrien vorhanden waren, sondern auch dass diese unterschiedliche Mitochondrientypen aufweisen, die möglicherweise mit einer variablen Anzahl an Atmungskettenkomplexen ausgestattet sind. Folgt man dieser Theorie, muss man erst das Mengenverhältnis dieser beiden Komplexe zueinander genau bestimmen, um eine Aussage bezüglich Mitochondrien ohne SDH-Gehalt innerhalb des Gewebes machen zu können.

Jedoch ist nicht eindeutig geklärt, wie das Verhältnis der Komplexe zueinander wirklich aussieht, da sich die beiden Arbeiten zum Teil widersprechen. Auch wurde das Verhältnis an Mitochondrien aus Herzmuskelzellen, aus Skelettmuskelzellen, aus dem Gehirn, aus der Leber und aus der Niere von Ratten, nicht aber an Mitochondrien aus der Lunge bestimmt und somit ist für die Lunge schwer eine Aussage über die Relation der Komplexe zueinander zu machen. In dieser Arbeit wurde zudem die Markierungsintensität der Herzmuskelzellen als Eichwert genutzt und für die anderen Gewebe der prozentuale Wert in Bezug auf diese errechnet, was deren Auswertung von den relativen Verhältnissen der Komplexe zueinander ablöst.

4.5 Vergleiche der immunhistochemischen und histochemischen Darstellung

Ergänzend zu der immunhistochemischen Darstellung wurde die SDH mittels Aktivitätsbestimmung in Form von Histochemie innerhalb der Gewebe bestimmt. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer Gegenüberstellung von Enzymaktivität und Proteinmenge. Auch hier wurden als Referenzwert für den Vergleich die Herzmuskelzellen gewählt.

Bei den Koronargefäßen zeigte sich bis auf die Untereinheit SDHC, die eine deutlich schwächere Markierung aufwies, kein signifikanter Unterschied zwischen den Untereinheiten und der SDH-Aktivität bei 5 min Inkubationszeit, jedoch eine signifikant höhere SDH-Aktivität bei 40 min Inkubationszeit. Warum die Enzymmenge, gemessen an der Intensität der Immunfluoreszenz, bei der Untereinheit C nicht mit der Enzymaktivität korreliert, lässt sich nur vermuten. Es könnte sich dabei um einen Messfehler handeln, oder die Untereinheit C, als Teil der integralen Membrandomäne, die primär für die Elektronenverschiebung zuständig ist, wird mengenmäßig weniger exprimiert als die anderen untersuchten Untereinheiten.

In der glatten Muskulatur der kleinen Lungengefäße korrelierte der Enzymgehalt mit der Enzymaktivität bei 5 min Inkubationszeit. Die SDH-Histochemie bei 40 min Inkubationszeit wies bis auf die Untereinheit B (monoklonal) keinen Unterschied zu den Untereinheiten auf, was vermutlich auf die längere Einwirkzeit zurückzuführen ist. Durch die bereits nach 20 Minuten auftretende lineare Enzymkinetik (Sättigung) ist eine Quantifizierung von histochemischen Signalen nur bei geringer Markierungsstärke, also weit vor der Sättigung, zulässig (Kugler 1988). Auch Bekedam et al. (2003) beobachteten bei einer Inkubationszeit von länger als 20 Minuten eine falsch hohe SDH-Aktivitätsmessung.

Durch die längere Einwirkzeit und die dadurch bedingten Übersättigung, kam es daher bei der SDH-Aktivität bei 40 min Inkubationszeit zu einer stärkeren Markierung, die statistisch signifikant zum Tragen kam.

In dem plurivakuolären Fettgewebe zeigte die SDHA als einzige der Untereinheiten keine Korrelation mit der Enzymaktivität. Sie zeigte eine signifikant höhere RGM als die der Histochemie, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den anderen Untereinheiten. Diese fehlende Korrelation zur Enzymaktivität könnte auf einer Messungenauigkeit beruhen, die durch die allgemeine starke Markierungsintensität des Fettgewebes zu Stande kam.

Bei der glatten Muskulatur der Bronchi sowie beim Bronchialepithel war die RGM der SDH-Histochemie deutlich niedriger als die der Untereinheiten. Lediglich die SDHC der glatten Muskulatur der Bronchi und die monoklonale SDHB des Bronchialepithels unterschieden sich auf Grund der breiten Streuung der Messwerte nicht statistisch signifikant von der Histochemie. Diese Diskrepanz zwischen der Enzymmenge und der Enzymaktivität könnte auf Grund der Enzymkinetik der SDH in diesen speziellen Geweben zu Stande kommen. Die K_m der histochemisch detektierbaren SDH-Aktivität ist mit 0,083 mM (gemessen in sympathischen Neuronen) (Baker und Santer 1990) sehr niedrig und somit die Affinität zu dem Substrat Succinat hoch. Dadurch kommt es zu einer schnelleren Substratsättigung und weniger Succinat wird umgesetzt. Geht man davon aus, dass die K_m der SDH in allen Geweben ungefähr gleich ist, könnte diese hohe Substrataffinität auch für andere Gewebe zutreffen und sich auf die Messergebnisse auswirken. Baker und Santer (1989) fanden zudem heraus, dass sich die V_{max} der SDH durch das Altern des Organismus ändert. So sank die V_{max} bei 24 Monate alten Ratten im Vergleich zu 6 Monate alten Ratten von 4,01 auf 2,07. Dies würde bedeuten, dass sich die Ergebnisse der SDH-Histochemie mit dem Alter der Tier ändern würden. In dieser Arbeit wurden allerdings Tiere desselben Alters verwendet, so dass die Ergebnisse der Histochemie problemlos miteinander verglichen werden können.

Die Unterschiede in der Enzymkinetik könnten auch auf das Vorhandensein von Isoenzymen der SDH zurückzuführen sein. Tomitsuka et al. (2003) entdeckten zwei verschiedene cDNAs für die humane Flavoproteinuntereinheit SDHA (Typ I Fp und Typ II Fp) im Skelettmuskel, in der Leber, im Gehirn, in der Niere und im Herzen eines Individuums. Typ I Fp wurde in allen Fällen stärker exprimiert als Typ II Fp. Biere et al. (2005) fanden in Zellen von Paragangliomen zwei Formen der Untereinheit A innerhalb einer Zelle, die offensichtlich für die Regulation des Substratumsatzes zuständig sind. Bei einem Defekt in einer der Untereinheiten kam es zu einer unkontrollierten Substratanhäufung.

Die Cytochrom C-Oxidase als Teil der Atmungskette von Hefen, Rindern und in menschlichem Gewebe besitzt gewebsspezifische Isoformen ihrer Untereinheiten, die an der Regulation der Substratumsetzung beteiligt sind (Burke & Poyton 1998). Dies könnte auch für die SDH der Fall sein, die mit gewebsspezifischen Isoformen ihre Aktivität reguliert.

Auch wäre denkbar, dass die SDH eine weitere Funktion im Zellstoffwechsel hat und nur ein Teil der Enzymmenge als SDH agiert.

Genau anders herum verhält es sich in den Alveolarsepten. Dort zeigten sich signifikant höhere RGM-Werte der Histochemie gegenüber den Untereinheiten. Bedingt durch eine breite Streuung der Messwerte unterschied sich nur die SDHB (polyklonal) nicht signifikant von der Histochemie. Die SDH in den Alveolarsepten zeigte im Vergleich mit den anderen Geweben allgemein eine etwas schwächere Markierungsintensität. Auch die Histochemie zeigte niedrigere Werte. Daraus kann man schließen, dass die Alveolarsepten einen niedrigeren SDH-Gehalt haben. Dass mehr Succinat umgesetzt wird, als es der immunhistochemisch nachweisbaren Enzymmenge entspricht, könnte das Resultat einer hohen Wechselzahl (= Substratumsatz in mol/s) bzw. einer niedrigen K_m der SDH sein. Sie würde dann in einer bestimmten Zeit, hier 5 und 40 min, mehr Substrat umsetzen als die SDH in anderen Geweben.

Paddenberg et al. (2003) fanden in ihrer Studie hypoxiebedingte Aktivitätsunterschiede der SDH, was möglicherweise auch unter Normoxie unter bestimmten Bedingungen stattfinden könnte. Genauere Studien am isolierten Enzym bei Hypoxie und Normoxie könnten mögliche Unterschiede in der Enzymkinetik der SDH in den einzelnen Geweben aufdecken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Enzymmenge und die Enzymaktivität in allen untersuchten Geweben, außer bei der glatten Muskulatur der Bronchi, der Alveolarsepten und dem Bronchialepithel, miteinander korrelieren.

4.6 Abschließende Betrachtungen

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelltypen in Herz und Lunge die untersuchten Komplex II-Untereinheiten exprimieren. Beim Vergleich der Untereinheiten innerhalb eines Gewebes zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Untereinheitenverteilung. Diese war innerhalb eines Gewebes annähernd gleich. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war es zu klären, ob die SDH-enthaltenden Zellen eine zur Proteinmenge korrelierende, histochemisch nachweisbare Enzymaktivität zeigen.

Die Enzymmenge sowie die Enzymaktivität wiesen gewebsspezifische Unterschiede auf, jedoch zeigte sich nicht in allen Geweben eine eindeutige Korrelation. Es bleibt deshalb noch zu klären, wie diese Unterschiede zu Stande kommen und was deren Ursache ist.

Mit Hilfe des Komplex V-Antikörpers als Mitochondrienmarker wurde untersucht, ob die Unterschiede des SDH-Gehalts der verschiedenen Gewebeanteile aus unterschiedlichen Mitochondrienmengen resultieren, oder ob die Zellen möglicherweise Mitochondrien ohne SDH enthalten, wie es zuvor für axonale Mitochondrien berichtet wurde. Alle untersuchten Gewebe zeigten ein Verhältnis des Komplexes V zu der SDH, welches für SDH-enthaltende Mitochondrien spricht. Die in dieser Arbeit immunhistochemisch ermittelten Verhältnisse von Komplex V zu SDH-Untereinheiten bestätigen das Vorliegen SDH-enthaltender Mitochondrien in allen untersuchten Gewebeanteilen von Herz und Lunge. Insbesondere gilt dies auch für die kleinen Lungenarterien, in denen in früheren histochemischen Arbeiten keine SDH-Aktivität nachgewiesen wurde (Thaete & Malkinson 1990), aufgrund funktioneller Daten jedoch eine Beteiligung der SDH am Sauerstoffsensormechanismus angenommen wurde (Cawthon et al. 2001; Paddenberg et al. 2003).

5. Zusammenfassung

Sauerstoff ist ein essenzielles Substrat für alle Säugetierzellen. Die Mechanismen der zellulären Sauerstoffmessung sind bislang noch nicht vollständig geklärt. In der hypoxie-abhängigen Regulation der Gentranskription spielen Prolylhydroxylasen eine entscheidende Rolle, bei der Einleitung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion sind hingegen andere Mechanismen aktiv. Als einer der hierbei beteiligten Kandidaten gilt Komplex II der mitochondrialen Atmungskette (Synonym: Succinatdehydrogenase = SDH). Frühere Arbeiten zeigten, dass SDH-Aktivität nicht ubiquitär in Mitochondrien nachweisbar ist. Sie fehlt beispielsweise in axonalen Endigungen und in einzelnen Zelltypen der Lunge. Ein erster Schritt in der Klärung der Fragestellung der Beteiligung der SDH an Sauerstoffsensormechanismen ist daher die Untersuchung von Zellen verschiedener Systeme auf das Vorhandensein von Komplex II.

Ziel dieser Arbeit war es, Gewebe von Herz und Lunge der Ratte auf das Vorhandensein von SDH sowie die Untereinheitenverteilung des Enzyms innerhalb der einzelnen Gewebe zu untersuchen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die SDH-enthaltenden Zellen eine zur Proteinmenge korrelierende, histochemisch nachweisbare Enzymaktivität zeigen und ob die Mitochondrienmenge einer Zelle mit dem SDH-Gehalt korreliert.

Der Proteingehalt an SDH-Untereinheiten wurde mittels quantitativer Immunfluoreszenz und die SDH-Enzymaktivität mittels quantitativer Histochemie bestimmt. Für die immunhistochemische Darstellung wurden Antikörper gegen die einzelnen SDH-Untereinheiten A, B, C und D durch Immunisierung von Kaninchen und Meerschweinchen hergestellt. Diesem folgte die Entwicklung eines optimierten Inkubationsprotokolls, das für die gesamte Untersuchung genutzt wurde. Des Weiteren wurde zum Vergleich ein kommerziell erhältlicher monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheit B eingesetzt. Zur Bestimmung der Mitochondrienmenge wurde der Komplex V immunhistochemisch bestimmt. Die glatte Muskulatur wurde mit einem Antikörper gegen α -Smooth muscle actin identifiziert.

Durch die Immunisierung mit für die einzelnen Untereinheiten spezifischen Peptidsequenzen und Affinitätsreinigung konnten immunhistochemisch nutzbare Antikörper für die SDH-Untereinheiten A, B und C generiert werden. Für die erfolgreiche immunhistochemische Darstellung war eine Mikrowellenbehandlung der Schnitte erforderlich. Der SDHD-Antikörper konnte hingegen auf Grund mangelnder Spezifität nicht zur weiteren Auswertung genutzt werden. Es zeigte sich, dass alle Zellen der untersuchten Gewebe SDH enthielten.

Insbesondere gilt dies auch entgegen früherer Arbeiten für die kleinen Lungenarterien und die Alveolarsepten. Grundsätzlich waren die immunhistochemisch detektierbaren SDH-Untereinheiten innerhalb eines Gewebes quantitativ gleichermaßen vertreten. Auch die immunhistochemisch bestimmte Enzymmenge und die histochemisch bestimmte Enzymaktivität korrelierten bis auf die Ausnahmen beim Bronchialepithel, den Alveolarsepten und der glatten Muskulatur der kleinen Bronchi ($< 100 \mu\text{m}$).

Beim Vergleich der SDH-Markierungsintensität mit der des Komplex V zeigten sich gewebespezifische Unterschiede, die für zelltypspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe sprechen. Besonders deutlich zeigte sich dies im plurivakuolären Fettgewebe, in dem die oxidative Phosphorylierung entkoppelt ist und dementsprechend eine proportional minimale Komplex V-Menge immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelltypen in Herz und Lunge SDH enthalten, wenn auch in gewebespezifischem Verhältnis zu Komplex V. Weiterhin sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine koregulierte Expression von SDH-Untereinheiten innerhalb einer Zelle. Dies gilt insbesondere auch für die kleinen Lungenarterien, in denen in früheren histochemischen Arbeiten keine SDH-Aktivität nachgewiesen wurde, aufgrund funktioneller Daten jedoch eine Beteiligung der SDH am Sauerstoffsensormechanismus angenommen wurde.

6. Summary

Oxygen is an essential substrate for all mammalian cells. The mechanisms of cellular oxygen sensing are still not fully understood. Prolylhydroxylases are key regulators of hypoxia-regulated gene transcription, while other, less characterized mechanisms operate in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Here, complex II of the mitochondrial respiratory chain (synonym: succinate dehydrogenase = SDH) is among the candidates initiating this hypoxic response. Previous work demonstrated that SDH activity is not ubiquitously found in mitochondria but lacks in axonal nerve endings and in some pulmonary cell types.

On this background, rat cardiopulmonary cell types were investigated for the presence of complex II in order to obtain basic information about its possible involvement in oxygen sensor mechanisms in these cells. Antisera directed against SDH subunits A, B, C and D were generated in rabbits and guinea-pigs and tested for their suitability for use in quantitative immunohistochemistry. In addition, a commercially available monoclonal SDH-B antibody was used for comparison, an anti- α -smooth muscle actin antibody served to identify smooth muscle cells, and a complex V-antibody served to label the total mitochondria content of the cells. SDH protein content, as determined by quantitative immunofluorescence, was compared to SDH activity, as determined by quantitative enzyme histochemistry.

Immunization with synthetic peptides and affinity purification yielded specific antisera for SDH subunits A, B and C, but not for SDH-D. Microwave treatment of tissue sections was required for successful immunohistochemical labelling. All investigated cell types of heart and lung contained immunoreactivity to these subunits and SDH enzyme activity. In particular, this also applied for smallest intra-acinar pulmonary arteries which previously have been described to lack SDH activity. In principle, the immunohistochemically detectable SDH subunits were contained in the same relative proportion within the different tissues. There was also a clear correlation between immunohistochemically quantified SDH subunits and histochemically assessed SDH activity, except for bronchial epithelium, the cells of the alveolar septum and smooth muscle of smallest bronchi (< 100 μ m). Comparison of SDH- and complex V-labelling revealed cell-type specific relative proportions suggesting cell-type specific compositions of the mitochondrial respiratory chain. This was particularly evident in mediastinal plurivacuolar fat tissue in which oxidative phosphorylation is uncoupled and where, accordingly, complex V was detectable by immunofluorescence in only minimal amounts.

Collectively, the present data demonstrate the presence of SDH in all investigated cell types of rat heart and lung with a cell-type specific relative proportion compared to complex V. Moreover, the data are suggestive for co-regulated expression of SDH subunits within all cells. In particular, this also applies for smallest intra-acinar pulmonary arteries in which previous histochemical studies failed to detect SDH activity although functional data have suggested a participation of SDH in the oxygen sensor mechanism of these vessels.

7. Literaturverzeichnis

Acker H. : Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism.
Respir Physiol. 1994 Vol. 95: 1-10.

Acker T, Acker H.: Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications.
J Exp Biol. 2004 Vol. 207: 3171-3188.

Ackrell BA.: Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II.
FEBS Lett. 2000 Vol. 466: 1-5.

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM.: An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Vol. 93: 12969-12973.

Archer S, Michelakis E.: The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O(2) sensors, and controversies.
News Physiol Sci. 2002 Vol. 17: 131-713.

Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E.: Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Vol. 101:11880-11885.

Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Skoldberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER.: Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma.
Am J Hum Genet. 2001 Vol. 69: 49-54

Astuti D, Hart-Holden N, Latif F, Lalloo F, Black GC, Lim C, Moran A, Grossman AB, Hodgson SV, Freemont A, Ramsden R, Eng C, Evans DG, Maher ER.: Genetic analysis of mitochondrial complex II subunits SDHD, SDHB and SDHC in paraganglioma and phaeochromocytoma susceptibility.
Clin Endocrinol (Oxf). 2003 Vol. 59: 728-733.

Astuti D, Morris M, Krona C, Abel F, Gentle D, Martinsson T, Kogner P, Neumann HP, Voutilainen R, Eng C, Rustin P, Latif F, Maher ER.: Investigation of the role of SDHB inactivation in sporadic phaeochromocytoma and neuroblastoma.
Br J Cancer. 2004 Vol. 91: 1835-1841.

Baker DM, Santer RM.: Development of a quantitative histochemical method for determination of succinate dehydrogenase activity in autonomic neurons and its application to the study of aging in the autonomic nervous system.
J Histochem Cytochem. 1990 Vol. 38:525-531.

Bánfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, Krause KH, Cox JA.: Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5).
J Biol Chem. 2004 Vol. 279:18583-18591.

Bayley JP, Devilee P, Taschner PE.: The SDH mutation database: an online resource for succinate dehydrogenase sequence variants involved in pheochromocytoma, paraganglioma and mitochondrial complex II deficiency.
BMC Med Genet. 2005 Vol. 6: 39.

Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW 3rd, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B: Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma.
Science. 2000 Vol. 287: 848-851.

Bekedam MA, van Beek-Harmsen BJ, Boonstra A, van Mechelen W, Visser FC, van der Laarse WJ.: Maximum rate of oxygen consumption related to succinate dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres of chronic heart failure patients and controls.
Clin Physiol Funct Imaging. 2003 Vol. 23:337-343.

Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Delage JP, Casteilla L, Letellier T, Rossignol R.: Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation.
Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Vol. 291:C1172-C1182

Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL.: Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines.
Cancer Res. 2000 Vol. 60: 7106-7113.

Bell EL, Emerling BM, Chandel NS.: Mitochondrial regulation of oxygen sensing.
Mitochondrion. 2005 Vol. 5: 322-332.

Benitez-Bribiesca L, Gomez-Camarillo M, Castellanos-Juarez E, Mravko E, Sanchez-Suarez P.: Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia.
Ann N Y Acad Sci. 2000 Vol. 926: 165-179.

Böttcher B.: ATP synthase. Is revolution effective?
EMBO Rep. 2000 Vol. 1: 223-224.

Boss O, Hagen T, Lowell BB.: Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism.
Diabetes. 2000 Vol. 49: 143-156.

Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, Munnich A, Rötig A.: Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency.
Nat Genet. 1995 Vol. 11:144-149.

Boyer PD.: Toward an adequate scheme for the ATP synthase catalysis.
Biochemistry (Mosc). 2001 Vol. 66: 1058-1066.

Brière JJ, Favier J, Bénit P, El Ghouzzi V, Lorenzato A, Rabier D, Di Renzo MF, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P.: Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1 α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet.* 2005 Vol. 14: 3263-3269.

Buckler KJ, Williams BA, Honore E.: An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol.* 2000 Vol. 525 Pt 1: 135-142.

Bunn HF, Gu J, Huang LE, Park JW, Zhu H.: Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol.* 1998 Vol. 201: 1197-1201.

Burke PV, Poyton RO.: Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. *J Exp Biol.* 1998 Vol. 201: 1163-1175.

Capaldi RA, Schulenberg B, Murray J, Aggeler R.: Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the Escherichia coli ATP synthase. *J Exp Biol.* 2000 Vol. 203: 29-33.

Cape JL, Strahan JR, Lenaeus MJ, Yuknis BA, Le TT, Shepherd JN, Bowman MK, Kramer DM.: The respiratory substrate rholoquinol induces Q-cycle bypass reactions in the yeast cytochrome bc(1) complex: mechanistic and physiological implications. *J Biol Chem.* 2005 Vol. 280: 34654-34660.

Carr HS, Maxfield AB, Horng YC, Winge DR.: Functional analysis of the domains in Cox11. *J Biol Chem.* 2005 Vol. 280: 22664-22669.

Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE.: Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem.* 2006 Vol. 281: 32724-32727.

Cawthon D, Beers K, Bottje WG.: Electron transport chain defect and inefficient respiration may underlie pulmonary hypertension syndrome (ascites)-associated mitochondrial dysfunction in broilers. *Poult Sci.* 2001 Vol. 80: 474-484.

Cecchini G, Maklashina E, Yankovskaya V, Iverson TM, Iwata S.: Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett.* 2003 Vol. 545: 31-38.

Cecchini G, Sices H, Schröder I, Gunsalus RP.: Aerobic inactivation of fumarate reductase from Escherichia coli by mutation of the [3Fe-4S]-quinone binding domain. *J Bacteriol.* 1995 Vol. 177: 4587-4592.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT.: Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Vol. 95: 11715-11720.

Chandel NS, Schumacker PT.: Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight.

J Appl Physiol. 2000 Vol. 88: 1880-1889.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ.: Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III.

J Biol Chem. 2003 Vol. 278: 36027-36031.

Crimi M, Papadimitriou A, Galbiati S, Palamidou P, Fortunato F, Bordoni A, Papandreou U, Papadimitriou D, Hadjigeorgiou GM, Drogari E, Bresolin N, Comi GP.: A new mitochondrial DNA mutation in ND3 gene causing severe Leigh syndrome with early lethality.

Pediatr Res. 2004 Vol. 55: 842-846.

Crofts AR, Shinkarev VP, Kolling DR, Hong S.: The modified Q-cycle explains the apparent mismatch between the kinetics of reduction of cytochromes c1 and bH in the bc1 complex.

J Biol Chem. 2003 Vol. 278: 36191-36201.

Des Tombe AL, Van Beek-Harmsen BJ, Lee-De Groot MB, Van Der Laarse WJ.:

Calibrated histochemistry applied to oxygen supply and demand in hypertrophied rat myocardium.

Microsc Res Tech. 2002 Vol. 58: 412-420.

Dimroth P, von Ballmoos C, Meier T.: Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series.

EMBO Rep. 2006 Vol. 7: 276-282.

Douwes Dekker PB, Hogendoorn PC, Kuipers-Dijkshoorn N, Prins FA, van Duinen SG, Taschner PE, van der Mey AG, Cornelisse CJ.: SDHD mutations in head and neck paragangliomas result in destabilization of complex II in the mitochondrial respiratory chain with loss of enzymatic activity and abnormal mitochondrial morphology.

J Pathol. 2003 Vol. 201: 480-486.

Esser L, Gong X, Yang S, Yu L, Yu CA, Xia D.: Surface-modulated motion switch: capture and release of iron-sulfur protein in the cytochrome bc1 complex.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Vol. 103: 13045-13050.

Fearnley IM, Carroll J, Shannon RJ, Runswick MJ, Walker JE, Hirst J.: GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).

J Biol Chem. 2001 Vol. 276: 38345-38348.

Fearon IM, Varadi G, Koch S, Isaacsohn I, Ball SG, Peers C.: Splice variants reveal the region involved in oxygen sensing by recombinant human L-type Ca(2+) channels.

Circ Res. 2000 Vol. 87: 537-539.

Flemming D, Hellwig P, Friedrich T.: Involvement of tyrosines 114 and 139 of subunit NuoB in the proton pathway around cluster N2 in Escherichia coli NADH:ubiquinone oxidoreductase.

J Biol Chem. 2003 Vol. 278: 3055-3062.

Fu XW, Wang D, Nurse CA, Dinauer MC, Cutz E.: NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Vol. 97:4374-4379.

Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R.: The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease.

Genes Dev. 2004 Vol. 18: 2183-2194.

Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin PF, Corvol P, Rotig A, Jeunemaitre X.: The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway.

Am J Hum Genet. 2001 Vol. 69: 1186-1197.

Görlach A, Berchner-Pfannschmidt U, Wotzlaw C, Cool RH, Fandrey J, Acker H, Jungermann K, Kietzmann T.: Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1.

Thromb Haemost. 2003 Vol. 89: 926-935.

Gutman M, Silam N.: The steady state activity of succinate dehydrogenase in the presence of opposing effectors. 1. The effect of L malate and CoQH₂ on the enzymic activity.

Mol Cell Biochem. 1975 Vol. 7: 51-58.

Hägerhäll C.: Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. Biochim Biophys Acta. 1997 Vol. 1320: 107-141.

Hajós F, Kerpel-Fronius S.: Electron microscope histochemical evidence for a partial or total block of the tricarboxylic acid cycle in the mitochondria of presynaptic axon terminals.

J Cell Biol. 1971 Vol. 51: 216-222.

Hanson BJ, Carrozzo R, Piemonte F, Tessa A, Robinson BH, Capaldi RA.: Cytochrome c oxidase-deficient patients have distinct subunit assembly profiles.

J Biol Chem. 2001 Vol. 276: 16296-16301.

Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, Flück M.: Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia.

Exp Physiol. 2003 Vol. 88: 109-119.

Horsefield R, Iwata S, Byrne B.: Complex II from a structural perspective.

Curr Protein Pept Sci. 2004 Vol. 5: 107-118.

Housteck J, Klement P, Floryk D, Antonická H, Hermanská J, Kalous M, Hansíková H, Hout'ková H, Chowdhury SK, Rosipal T, Kmoch S, Stratilová L, Zeman J.: A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin.
Hum Mol Genet. 1999 Vol. 8: 1967-1974.

Huang LS, Cobessi D, Tung EY, Berry EA.: Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc₁ complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern.
J Mol Biol. 2005 Vol. 351: 573-597.

Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K.: A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes.
Nature. 1998 Vol. 394: 694-697.

Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Günzler V, Kondo K, Yang H, Sorokina I, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG.: Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Vol. 99: 13459-13464.

Janin J.: Janin accessibility scale.
Nature (London) 1979 Vol. 277: 491

Jezeck P, Záčková M, Růžicka M, Skobisová E, Jabůrek M.: Mitochondrial uncoupling proteins-facts and fantasies.
Physiol Res. 2004 Vol. 53: S199-211.

Johnson RP, O'Kelly IM, Fearon IM.: System-specific O₂ sensitivity of the tandem pore domain K⁺-channel TASK-1.
Am J Physiol Cell Physiol. 2004 Vol. 286: C391-397.

Karp G.: Molekulare Zellbiologie.
Springer 4. Auflage 2005

Karplus PA, Schulz GE.: Bulk hydrophobic scale.
Naturwissenschaften 1985 Vol. 72: 212.

Keating DJ, Rychkov GY, Giacomini P, Roberts ML.: Oxygen-sensing pathway for SK channels in the ovine adrenal medulla.
Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005 Vol. 32: 882-887.

Kroll SL, Czyzyk-Krzeska MF.: Role of H₂O₂ and heme-containing O₂ sensors in hypoxic regulation of tyrosine hydroxylase gene expression.
Am J Physiol. 1998 Vol. 274: C167-174.

Kugler P.: Quantitative enzyme histochemistry in the brain.
Histochemistry. 1988 Vol. 90: 99-107.

Kummer W, Yamamoto Y.: Cellular distribution of oxygen sensor candidates-oxidases, cytochromes, K⁺-channels in the carotid body.
Microsc Res Tech. 2002 Vol. 59: 234-242.

Lahiri S, Ehleben W, Acker H.: Chemoreceptor discharges and cytochrome redox changes of the rat carotid body: role of heme ligands.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Vol. 96: 9427-9432.

Lahiri S.: Historical perspectives of cellular oxygen sensing and responses to hypoxia.
J Appl Physiol. 2000 Vol. 88: 1467-1473.

Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR.: Oxygen sensing in the body.
Prog Biophys Mol Biol. 2006 Vol. 91: 249-286.

Lancaster CR.: Succinate:quinone oxidoreductases: an overview.
Biochim Biophys Acta. 2002 Vol. 1553: 1-6.

Leach RM, Hill HM, Snetkov VA, Robertson TP, Ward JP.: Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor.
J Physiol. 2001 Vol. 536: 211-224.

Löffler M, Becker C, Wegerle E, Schuster G.: Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria.
Histochem Cell Biol. 1996 Vol. 105:119-128.

López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, Molina A, Franco-Obregón A, Ureña J, Castellano A.: Oxygen sensing by ion channels.
Kidney Int. 1997 Vol. 51: 454-461.

López-Barneo J, del Toro R, Levitsky KL, Chiara MD, Ortega-Sáenz P.: Regulation of oxygen sensing by ion channels.
J Appl Physiol. 2004 Vol. 96: 1187-1195.

Maher ER, Eng C.: The pressure rises: update on the genetics of pheochromocytoma.
Hum Mol Genet. 2002 Vol. 11: 2347-2354.

Maklashina E, Kotlyar AB, Karliner JS, Cecchini G.: Effect of oxygen on activation state of complex I and lack of oxaloacetate inhibition of complex II in Langendorff perfused rat heart.
FEBS Lett. 2004 Vol. 556: 64-68.

Maneg O, Ludwig B, Malatesta F.: Different interaction modes of two cytochrome-c oxidase soluble CuA fragments with their substrates.
J Biol Chem. 2003 Vol. 278: 46734-46740.

McLennan HR, Degli Esposti M.: The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species.
J Bioenerg Biomembr. 2000 Vol. 32: 153-162.

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J.: Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing.

J Cell Sci. 2003 Vol. 116: 1319-1326.

Morris AA, Leonard JV, Brown GK, Bidouki SK, Bindoff LA, Woodward CE, Harding AE, Lake BD, Harding BN, Farrell MA, Bell JE, Mirakhor M, Turnbull DM.: Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease.

Ann Neurol. 1996 Vol. 40: 25-30.

Murray J, Marusich MF, Capaldi RA, Aggeler R.: Focused proteomics: monoclonal antibody-based isolation of the oxidative phosphorylation machinery and detection of phosphoproteins using a fluorescent phosphoprotein gel stain.

Electrophoresis 2004 Vol.25: 2520-2525.

Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Hirofuji C, Itoh K, Itoh M, Ishihara A.: Succinate dehydrogenase activities of fibers in the rat extensor digitorum longus, soleus, and cardiac muscles.

Arch Histol Cytol. 1999 Vol. 62: 393-399.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M.: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.

Nature. 2000 Vol. 404: 787-790.

Noji H, Yoshida M.: The rotary machine in the cell, ATP synthase.

J Biol Chem. 2001 Vol. 276: 1665-1668.

Nussbaum RL.: Mining yeast in silico unearths a golden nugget for mitochondrial biology.

J Clin Invest. 2005 Vol. 115: 2689-2691.

Olgun A.: Biological effects of deuteronation: ATP synthase as an example.

Theor Biol Med Model. 2007 Vol. 4: 9.

Paddenberg R, Goldenberg A, Faulhammer P, Braun-Dullaues RC, Kummer W.: Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced ROS generation and vasoconstriction in the pulmonary vasculature.

Adv Exp Med Biol. 2003 Vol. 536:163-169.

Paddenberg R, König P, Faulhammer P, Goldenberg A, Pfeil U, Kummer W.: Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices.

Respir Res. 2006 Vol. 7: 93.

Palsdottir H, Lojero CG, Trumpower BL, Hunte C.: Structure of the yeast cytochrome bc1 complex with a hydroxyquinone anion Qo site inhibitor bound.

J Biol Chem. 2003 Vol. 278: 31303-31311.

Papa S.: Role of cooperative H(+)/e(-) linkage (redox bohr effect) at heme a/Cu(A) and heme a(3)/Cu(B) in the proton pump of cytochrome c oxidase. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Vol. 70: 178-186.

Parker JMR, Guo D, Ilodges RS.: Hydrophilicity scales. *Biochemistry* 1986 Vol. 25: 5425.

Pawlu C, Bausch B, Neumann HP.: Mutations of the SDHB and SDHD genes. *Fam Cancer*. 2005 Vol. 4: 49-54

Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR & Gonzalez C.: Kvbeta1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to Kv4.2 but not to *J Gen Physiol*. 1999 Vol. 113: 897-907.

Pérez-García MT, Colinas O, Miguel-Velado E, Moreno-Domínguez A, López-López JR.: Characterization of the Kv channels of mouse carotid body chemoreceptor cells and their role in oxygen sensing. *J Physiol*. 2004 Vol. 557: 457-471.

Piruat JI, Pintado CO, Ortega-Sáenz P, Roche M, López-Barneo J.: The mitochondrial SDHD gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2004 Vol. 24: 10933-10940.

Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP.: The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase und succinate dehydrogenase. *Ann Med*. 2003 Vol. 35: 632-639

Prabhakar NR.: O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol*. 2006 Vol. 91: 17-23.

Roy C, Lancaster CR, Kröger A.: Succinate: quinine oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Vol. 1459: 422-431.

Rustenbeck I, Dickel C, Herrmann C, Grimmsmann T.: Mitochondria present in excised patches from pancreatic B-cells may form microcompartments with ATP-dependent potassium channels. *Biosci Rep*. 1999 Vol. 19: 89-98.

Schägger H, Pfeiffer K.: The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*. 2001 Vol. 276: 37861-37857.

Srinivas V, Zhu X, Salceda S, Nakamura R, Caro J.: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) is a non-heme iron protein. Implications for oxygen sensing. *J Biol Chem*. 1998 Vol. 273: 18019-18022.

Streller T, Huckstorf C, Pfeiffer C, Acker H.: Unusual cytochrome a592 with low PO₂ affinity correlates as putative oxygen sensor with rat carotid body chemoreceptor discharge.

FASEB J. 2002 Vol.16:1277-1279

Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z.: Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II.

Cell. 2005 Vol. 121: 1043-1057.

Szentagothai J.: Zum elementaren Bau der interneuronalen Synapse.

Acta anat. 1957 Vol. 30: 827-841.

Tan AK, Ramsay RR, Singer TP, Miyoshi H.: Comparison of the structures of the quinone-binding sites in beef heart mitochondria.

J Biol Chem. 1993 Vol. 268:19328-19333.

Thaete LG, Malkinson AM.: Differential staining of normal and neoplastic mouse lung epithelia by succinate dehydrogenase histochemistry.

Cancer Lett. 1990 Vol. 52: 219-227.

Tomitsuka E, Goto Y, Taniwaki M, Kita K.: Direct evidence for expression of type II flavoprotein subunit in human complex II (succinate-ubiquinone reductase).

Biochem Biophys Res Commun. 2003 Vol. 311: 774-779.

Trumpower BL.: The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex.

J Biol Chem. 1990 Vol. 265: 11409-11412.

Velez M, Machado A, Satrustegui J.: Age-dependent modifications of rat heart succinate dehydrogenase.

Mechanisms of Ageing and Development Vol. 32: 131-140

Wang D, Youngson C, Wong V, Yeger H, Dinauer MC, Vega-Saenz Miera E, Rudy B, Cutz E.: NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺-channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines.

Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Vol. 93:13182-13187.

Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT.: Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing.

Circ Res. 2001 Vol. 88: 1259-1266.

Waypa GB, Schumacker PT.: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing.

J Appl Physiol. 2005 Vol. 98: 404-414.

Wenger RH, Bauer C.: Oxygen sensing: "hydroxy" translates "oxy".

News Physiol Sci. 2001 Vol. 16: 195-196.

Young AL, Baysal BE, Deb A, Young WF.: Familial malignant catecholamine-secreting paraganglioma with prolonged survival associated with mutation in the succinate dehydrogenase B gene.

J Clin Endocrinol Metab. 2002 Vol. 87: 4101-4105.

Youngson C, Nurse C, Yeger H, Curnutte JT, Vollmer C, Wong V, Cutz E.: Immunocytochemical localization on O₂-sensing protein (NADPH oxidase) in chemoreceptor cells.

Microsc Res Tech. 1997 Vol.37:101-106.

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS.: HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation.

Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Vol. 98: 9630-9635.

Yu L, Xu JX, Haley PE, Yu CA.: Properties of bovine heart mitochondrial cytochrome b560.

J Biol Chem. 1987 Vol. 262: 1137-1143.

Zmijewski JW, Landar A, Watanabe N, Dickinson DA, Noguchi N, Darley-Usmar VM.: Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium.

Biochem Soc Trans. 2005 Vol. 33: 1385-1389.

8. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter Wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

9. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Er hat der Bezeichnung „Doktorvater“ alle Ehre gemacht, nicht nur indem er mich bei aufkommenden Problemen im Verlauf der Arbeit unterstützt hat, sondern auch schon fast mit väterlicher Geduld meine Zweifel zerstreut und manche gedankliche Irrfahrt auf die richtige Bahn gelenkt hat.

Bei Frau PD Dr. Katrin Lips und Frau Dr. Renate Paddenberg möchte ich mich herzlich bedanken für ihre Unterstützung bei der Antikörperherstellung und die zahlreichen fachlichen Anregungen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Martin Bodenbenner, Frau Petra Faulhammer und Frau Anna Goldberg für die Unterstützung bei der Bewältigung labortechnischer Aufgaben.

Frau Patricia Berger danke ich für die vielen netten Gespräche und die Hilfestellung bei verwaltungstechnischen Aufgaben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Eltern und meinen Mann Benjamin für die Ermöglichung des Studiums und die Unterstützung während der Studienzzeit.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**