

# Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg



Bachelorarbeit

## **Beeinflussung der mitochondrialen Bioenergetik durch permanente polymorphe Magnetfelder**

Jonas Heisterkamp

Betreuer:

Prof. Dr. Brigitte König

Prof. Dr. Gerhard Jorch

## Zusammenfassung

In der Medizin werden seit langem Magnetfelder verschiedener Art zur Therapie unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt. Einen neuen Typen stellen hierbei permanente polymorphe Magnetfelder dar, die ohne Strom arbeiten. Aufgrund einer mosaikartigen abwechselnden Anordnung von Positiv- und Negativpolen entsteht ein inhomogenes Magnetfeld, das in der Lage ist, mit beweglichen Strukturen innerhalb eines Organismus in Wechselwirkung zu treten. Beim Menschen sind dies vorrangig Körperflüssigkeiten wie etwa Blut oder Lymphe. Diese erfahren beim Vorbeifließen an der komplexen Polanordnung einen elektromagnetischen Einfluss.

Die Mitochondrien als „Kraftwerke der Zelle“ sind die Orte der Energieproduktion in menschlichen Zellen. Gerade in Immunzellen spielen Mitochondrien eine grundlegende Rolle bei zellulärer Aktivität, Proliferation und Differenzierung. Schon seit einiger Zeit wird vermutet, dass eine Fehlfunktion der Mitochondrien und eine damit einhergehende Störung der ATP-Produktion sowohl Grundlage als auch Ergebnis vieler Erkrankungen sind. Zur Beurteilung des Gesundheitsstatus‘ von Mitochondrien wird bei medizinischen Untersuchungen der Bioenergetische Gesundheitsindex (BHI) herangezogen. Über verschiedene Größen der mitochondrialen Atmung kann so eine Aussage zum metabolischen Potential einer Zelle getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob polymorphe permanente Magnetfelder in Form der Kleinschen Felder einen Einfluss auf die Bioenergetik von Mitochondrien ausüben. Als Zielzellen wurden dafür THP-1-Zellen sowohl als Suspensions-, als auch als PMA-differenzierte Zellen verwendet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche der Stimulation von menschlichen Immunzellen mit permanenten polymorphen Magnetfeldern zeigen, dass es einen Effekt der Kleinschen Felder auf die Mitochondrien gibt, der sich in der mitochondrialen Atmung widerspiegelt. Vielfach auftretende höhere Werte bei den stimulierten Zellen im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen gehen dabei auf eine gesteigerte Aktivität der Mitochondrien zurück. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass polymorphe permanente Magnetfelder einen Beitrag zur Steigerung des metabolischen Potentials von menschlichen Immunzellen leisten können.

## Abstract

The medicine has used magnetic fields of various types for a long time to treat different diseases. New types are persistent polymorphous magnetic fields without using power. Due to a mosaic-like alternating structure of positive and negative poles an inhomogeneous magnetic field is generated that is able to interact with motile structures of an organism. In humans these structures are primarily body fluids like blood or lymph. When they flow past the sophisticated arrangement they get an electromagnetic influence.

The mitochondrion as the 'powerhouse of the cell' is the place of energy production in human cells. Especially in immune cells the mitochondria are a basic part of cellular activity, proliferation and differentiation. For some while it is suspected that a dysfunction of mitochondria and a disorder of ATP production, which comes along with, are both basis and result of many diseases. In order to evaluate the health condition of mitochondria the Bioenergetic Health Index (BHI) is used as an indicator of cellular and mitochondrial health. Declarations about the metabolic potential of a cell can be made by different factors of mitochondrial respiration.

In the present thesis it should be examined if polymorphous persistent magnetic fields in the form of Kleinsche Felder have an influence on the bioenergetics of mitochondria. THP-1-suspension and PMA-differentiated THP-1-cells were used as target cells. The attempts performed in this thesis of stimulating human immune cells with persistent polymorphous magnetic fields show an effect of the Kleinsche Felder on the mitochondria, which can be watched in the mitochondrial respiration. Multiply occurring high values of stimulated cells compared to non-stimulated cells trace back to an enhanced activity of mitochondria. These results lead to the conclusion that polymorphous persistent magnetic fields can contribute to the increase of metabolic potential of human immune cells.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Bachelorarbeit stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Bachelorarbeit eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

---

Magdeburg, 29.11.2017

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Abstract .....	II
Eidesstattliche Erklärung .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	X
Abkürzungen .....	XIII
Einheiten.....	XV
1. Einleitung .....	1
1.1. Kleinsche Felder.....	3
1.2. Mitochondrien.....	3
1.3. Bioenergetischer Gesundheitsindex.....	7
2. Material und Methoden .....	10
2.1. Materialien.....	10
2.2. Reagenzien und Medien.....	12
2.3. Geräte .....	13
2.3.1. <i>Cellometer Vision (Nexcelom Bioscience)</i> .....	14
2.3.2. <i>Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies)</i> .....	15
2.4. Vorbereitungen für Untersuchungen von Zellen im <i>Seahorse</i> .....	15
2.5. Anzucht von Zellen aus der Kryokultur .....	18
2.6. Kultivierung und Pflege der Zellen.....	19
2.7. Stimulation der Zellen mit Magnetstreifen .....	20
2.8. Aufarbeitung der Zellen für Untersuchungen im <i>Seahorse</i> .....	22
3. Ergebnisse .....	24
3.1. THP-1-Zellen .....	24

3.1.1.	Vorversuch.....	24
3.1.2.	1h Stimulation .....	29
3.1.3.	4h Stimulation .....	35
3.1.4.	8h Stimulation .....	41
3.1.5.	24h Stimulation .....	47
3.1.6.	Kinetik der mitochondrialen Atmung .....	54
3.2.	PMA-differenzierte Zellen .....	56
3.2.1.	Vorversuch.....	56
3.2.2.	1h Stimulation .....	61
3.2.3.	4h Stimulation .....	67
3.2.4.	24h Stimulation .....	73
4.	Diskussion.....	79
4.1.	Auswertung der THP-1-Suspensionszellen .....	79
4.2.	Auswertung der PMA-differenzierten THP-1-Zellen.....	82
4.3.	Fazit.....	83
	Literaturverzeichnis .....	87

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines Mitochondriums (Boujard et al. 2014).....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Tricarbonsäure-Zyklus (Plattner und Hentschel 2011) .....	5
Abbildung 3: Darstellung der oxidativen Phosphorylierung (Plattner und Hentschel 2011) .....	6
Abbildung 4: Modellverlauf der Oxygen Consumption Rate (OCR) über die Zeit (Agilent Technologies).....	8
Abbildung 5: Magnetstreifen der Firma BIORELAX.....	21
Abbildung 6: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O <sub>2</sub> /min	24
Abbildung 7: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion (dargestellt sind die fünf Einzelergebnisse in pmol O <sub>2</sub> /min) .....	26
Abbildung 8: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O <sub>2</sub> /min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion .....	26
Abbildung 9: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....	27
Abbildung 10: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....	28
Abbildung 11: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O <sub>2</sub> /min.....	29
Abbildung 12: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O <sub>2</sub> /min.....	31
Abbildung 13: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O <sub>2</sub> /min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion .....	32
Abbildung 14: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....	33

<i>Abbildung 15: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %...</i>	33
<i>Abbildung 16: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	35
<i>Abbildung 17: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	37
<i>Abbildung 18: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion .....</i>	38
<i>Abbildung 19: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	39
<i>Abbildung 20: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....</i>	39
<i>Abbildung 21: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	41
<i>Abbildung 22: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	43
<i>Abbildung 23: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion .....</i>	44
<i>Abbildung 24: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	45
<i>Abbildung 25: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....</i>	45
<i>Abbildung 26: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	47
<i>Abbildung 27: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	49

<i>Abbildung 28: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion .....</i>	50
<i>Abbildung 29: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	52
<i>Abbildung 30: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....</i>	52
<i>Abbildung 31: Entwicklung der mitochondrialen Atmung der stimulierten THP-1-Zellen in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	54
<i>Abbildung 32: Entwicklung der mitochondrialen Atmung der nicht-stimulierten THP-1-Zellen in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	55
<i>Abbildung 33: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	56
<i>Abbildung 34: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	58
<i>Abbildung 35: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion .....</i>	58
<i>Abbildung 36: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	59
<i>Abbildung 37: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %... </i>	60
<i>Abbildung 38: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	61
<i>Abbildung 39: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	63
<i>Abbildung 40: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion .....</i>	64

<i>Abbildung 41: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....</i>	65
<i>Abbildung 42: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %...</i>	66
<i>Abbildung 43: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	67
<i>Abbildung 44: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	69
<i>Abbildung 45: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP- Produktion .....</i>	69
<i>Abbildung 46: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....</i>	71
<i>Abbildung 47: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %...</i>	71
<i>Abbildung 48: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	73
<i>Abbildung 49: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	75
<i>Abbildung 50: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP- Produktion .....</i>	75
<i>Abbildung 51: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....</i>	77
<i>Abbildung 52: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %...</i>	77

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Stocklösungen</i> .....	16
<i>Tabelle 2: Arbeitslösungen</i> .....	16
<i>Tabelle 3: Befüllung Sensor</i> .....	17
<i>Tabelle 4: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min</i> .....	25
<i>Tabelle 5: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %</i> .....	27
<i>Tabelle 6: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)</i> 28	
<i>Tabelle 7: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min</i> .....	30
<i>Tabelle 8: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %</i> .....	32
<i>Tabelle 9: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)</i> .....	34
<i>Tabelle 10: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min</i> .....	36
<i>Tabelle 11: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %</i> .....	38
<i>Tabelle 12: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)</i> .....	40
<i>Tabelle 13: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min</i> .....	42
<i>Tabelle 14: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %</i> .....	44
<i>Tabelle 15: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)</i> .....	46

<i>Tabelle 16: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatemung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatemung (MA), Reserveatemungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min .....</i>	48
<i>Tabelle 17: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatemungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	51
<i>Tabelle 18: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI) .....</i>	53
<i>Tabelle 19: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatemung (MA), Reserveatemungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	57
<i>Tabelle 20: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Reserveatemungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	59
<i>Tabelle 21: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI).....</i>	60
<i>Tabelle 22: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatemung (MA), Reserveatemungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	62
<i>Tabelle 23: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatemungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	64
<i>Tabelle 24: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI).....</i>	66
<i>Tabelle 25: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatemung (MA), Reserveatemungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	68
<i>Tabelle 26: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatemungskapazität und Kopplungseffizienz in %.....</i>	70
<i>Tabelle 27: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI).....</i>	72
<i>Tabelle 28: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatemung (MA), Reserveatemungskapazität (RAK), nicht-</i>	

<i>mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min.....</i>	74
<i>Tabelle 29: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen:</i>	
<i>Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in % .....</i>	76
<i>Tabelle 30: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI).....</i>	
	78

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AO/PI	Acridin Orange/Propidium Iodid
BA	Basalatmung
BHI	bioenergetic health index/Bioenergetischer Gesundheitsindex
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECAR	extracellular acidification rate/extrazelluläre Ansäuerungsrate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetal Bovine Serum
FCCP	Carbonyl cyanide-p- trifluoromethoxyphenylhydrazone
Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>	Eisen
H	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MA	Maximalatmung
mATP	mitochondriale ATP-Produktion
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup> / NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nmA	nicht-mitochondriale Atmung
NTC	Negativkontrolle
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OCR	oxygen consumption rate/Sauerstoffverbrauchsrate
P <sub>i</sub>	anorganische Phosphatgruppe

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDL	Poly-D-lysine
PL	Protonenleck
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RAK	Reserveatmungskapazität
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMI-KM	Komplettmedium
RPMI-Mess	Messmedium
VE-H <sub>2</sub> O	vollentsalzenes Wasser
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche

## Einheiten

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
pmol	Pikomol
U	Units

## 1. Einleitung

„Die elektromagnetische Energie ist die elementare Energieform, von der jedes Leben eines Organismus abhängt.“ Dieses Zitat wird Werner Heisenberg zugeschrieben, der 1932 den Physik-Nobelpreis für seine Arbeit im Bereich der Quantenmechanik erhielt. Neben den klassischen Methoden in der sogenannten „Schulmedizin“ werden heutzutage im Bereich der „alternativen Medizin“ Verfahren angewandt, die schon seit Jahrhunderten Verwendung finden und auf möglichst natürliche Art und Weise Hilfe bei Erkrankungen und körperlichen Beschwerden versprechen. Einen Schwerpunkt stellen Behandlungen und Therapien dar, die auf elektromagnetische Kräfte zurückgreifen. Die Idee der Nutzung künstlich erzeugter Magnetfelder als Anwendungen bei Patienten beruht auf der Grundlage des ständigen Magnetfeldes der Erde und der elektrochemischen Vorgänge im Menschen. Treten beispielsweise schwere Erkrankungen auf, so stehen diese im Zusammenhang mit einer Störung der normalen Funktionalität von Zellen. Der Einsatz schwacher Magnetfelder zielt darauf ab, die Rückkehr betroffener Zellen in ihren Normalzustand zu fördern und somit eine Verbesserung des Gesundheitszustandes des Patienten zu erreichen.

Alle Zellen des menschlichen Körpers betreiben Stoffwechselreaktionen (Metabolismus), die der Erhaltung oder dem Aufbau von Zellmaterial dienen (Anabolismus) oder die körpereigene und körperfremde Stoffe abbauen (Katabolismus). Während anabolische Vorgänge unter Energieverbrauch stattfinden wird durch katabolische Prozesse unter anderem Energie gewonnen. Für alle metabolischen Abläufe werden Enzyme benötigt. Diese binden spezifisch Moleküle und wirken als Katalysatoren, indem sie die Aktivierungsenergie chemischer Reaktionen herabsetzen und somit Stoffumwandlungen beschleunigen. Dabei verbrauchen Enzyme Energie, die die Zellen bereitstellen müssen. Hauptenergieträger ist das Adenosintriphosphat (ATP), bei dem durch die Abspaltung einer anorganischen Phosphat-Gruppe ( $P_i$ ) Energie freigesetzt wird. Während der Umwandlung von Substraten ändern Enzyme ihre Konformation. Diese Änderung stellt Arbeit für das Enzym dar und bedarf daher Energie. Wird ATP zu

Adenosindiphosphat (ADP) und  $P_i$  hydrolysiert, können Enzyme den anorganischen Phosphat-Rest binden und werden dadurch energetisiert (Protein-Phosphorylierung).

Die Bereitstellung der Energie in Form von ATP wird durch die Mitochondrien einer Zelle übernommen. In ihnen findet die oxidative Phosphorylierung statt, die aus den Stoffwechselprodukten der Glykolyse oder alternativ aus der Verbrennung von Fettsäuren über mehrere Schritte ATP generiert. Da Zellen ohne Energie nicht arbeiten und überleben können, kommt den Mitochondrien eine grundlegende Rolle bei der Integrität von Zellen zu. Eine Fehlfunktion der Mitochondrien führt zu Mitochondriopathien, die gerade in Körperbereichen mit hoher Energieanforderung wie der Muskulatur oder dem Nervensystem zu großen Schäden führen können (Hofmann und Bauer 2005). Einige neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Lee et al. 2017) und Morbus Parkinson (Franco-Iborra et al. 2016) sowie Diabetes (Chen et al. 2012), Krebs (Zong et al. 2016) und Herz-Kreislaufkrankungen (Lemieux und Hoppel 2009) stehen im Zusammenhang mit einer Schädigung der Mitochondrien. Diese kann aufgrund einer fehlerhaften Replikation der Mitochondrien auftreten oder durch Störungen in den Stoffwechselwegen der ATP-Produktion verursacht werden.

Ausgehend von der Annahme, dass vereinzelte magnetischer Felder einen positiven Effekt auf Patienten haben können, indem sie z.B. auf in ihrer Funktionalität eingeschränkte Zellen wirken, stellt sich zunächst die Frage, inwieweit solche Magnetfelder gesunde Zellen beeinflussen. Bernhard Klein vom Institut für Naturheilverfahren und physikalische Anwendungen in Bremen hat schwache permanente inhomogene Magnetfelder entwickelt, die zum Beispiel in Form einer Matratzenauflage über mehrere Stunden kontinuierlich auf einen Patienten einwirken können. Die nach ihrem Erfinder benannten Kleinschen Felder gehen dabei Wechselwirkungen mit einzelnen Strukturen im Körper ein und zielen unter anderem auf eine bessere Nährstoffversorgung von Zellen ab.

Zur Untersuchung des Einflusses permanenter Magnetfelder auf gesunde Zellen bedarf es messbarer zellulärer Parameter, die Auskunft über den allgemeinen Zustand der Zellen geben können. Unabhängig vom Zelltyp lassen sich Aussagen über die Aktivität einer Zelle anhand ihres metabolischen Potentials treffen. Als

Energieträger der meisten Vorgänge in menschlichen Zellen fungiert das in den Mitochondrien gebildete ATP. Eine Betrachtung des 'Bioenergetischen Gesundheitsindex' (BHI) kann Informationen über energetische Vorgänge in Mitochondrien liefern und eine Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Zellen ermöglichen.

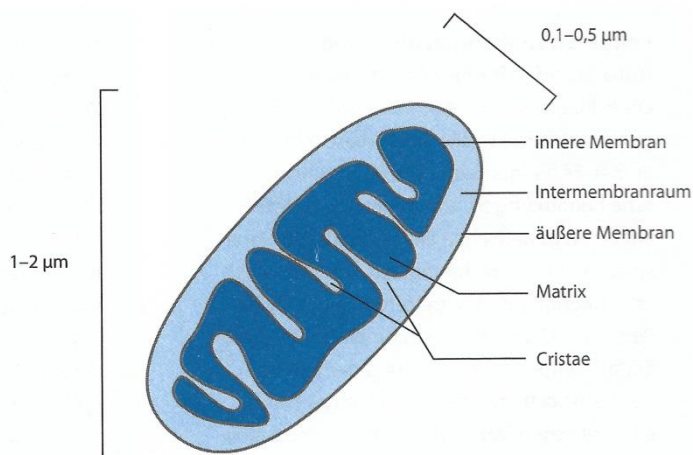
### **1.1.Kleinsche Felder**

Kleinsche Felder sind schwache permanente polymorphe Magnetfelder, die im Gegensatz zu sonst häufig eingesetzten pulsierenden Magnetfeldern ohne Strom arbeiten. Pulsierende Magnetfelder erzeugen schwache oszillierende magnetische Impulse, die Zellen im Körper anregen sollen, indem Energie durch die Impulse auf die Zellen übertragen wird. Kleinsche Felder generieren ebenfalls ein schwaches Magnetfeld, das jedoch nicht pulsiert, sondern permanent vorhanden ist. Zurückzuführen ist dies auf Positiv- und Negativpole mit einer Größe von wenigen Millimetern, die schachbrettartig angeordnet sind. Durch die ständig wechselnde Polung der Magnete wird ein schwaches Magnetfeld erzeugt, das inhomogen bzw. polymorph ist. Dieses Feld kann aufgrund seiner Statik keine Wechselwirkungen mit stationären Strukturen eingehen. Nur bewegliche Strukturen im Körper wie Blut oder Lymphe, die sich über ein solches permanentes polymorphes Magnetfeld bewegen, erfahren einen elektromagnetischen Einfluss.

### **1.2.Mitochondrien**

Da jede Zelle im Zuge ihrer spezifischen Stoffwechselreaktionen ATP verbraucht, muss dieses kontinuierlich in den Mitochondrien aufgebaut werden. Jede Zelle ist energetisch autonom und produziert die Menge an Energie, die sie benötigt. In allen Mitochondrien laufen die gleichen Prozesse ab, jedoch kann die Anzahl an Mitochondrien abhängig vom Zelltyp und somit die Menge an bereitgestellter Energie

variieren. Der strukturelle Aufbau eines Mitochondriums ist in *Abbildung 1* dargestellt. Mitochondrien besitzen ebenso wie der Zellkern eine Doppelmembran. Zwischen der Außen- und der Innenmembran befindet sich ein Intermembranraum, der auch als perimitochondrialer Spalt bezeichnet wird. Ionen und kleine Moleküle können durch die äußere Membran diffundieren, wohingegen ein Transport durch die Innenmembran nur über spezifische Proteine (Carrier) möglich ist. Sauerstoff ( $O_2$ ) und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) können beide Membranen ungehindert passieren. Das für die Prozesse der Energiegewinnung benötigte Pyruvat wird aus dem Cytosol mittels eines Pyruvat-Shuttles durch die innere Mitochondrienmembran geschleust. Der Austausch von ADP und ATP durch die Innenmembran erfolgt über einen Antiporter. Der Innenraum des Mitochondriums (Mitochondrien-Matrix) wird durch die innere Membran umschlossen, die mehrere Einstülpungen (Cristae) in die Matrix besitzt. Die Membran der Cristae wird von ATP-Synthasen und weiteren Membranproteinen durchspannt, die an der Synthese des ATP beteiligt sind.



**Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines Mitochondriums (Boujard et al. 2014)**

Die Energiegewinnung in Mitochondrien besteht aus mehreren hintereinandergeschalteten Prozessen (s. *Abbildung 2*). Im Matrixraum wird das aus der im Cytosol bei der Glykolyse gebildete Pyruvat (Brenztraubensäure) weiterverarbeitet, bevor es in den Tricarbonsäure-Zyklus (Citrat-Zyklus) einfließt. Unter der Abspaltung von  $CO_2$  (Decarboxylierung) und Wasserstoff (H; Oxidation) entsteht aus dem Pyruvat Acetat (Essigsäure), das mit Coenzym A (CoA) den Acetyl-CoA-Komplex bildet. Der freigewordene Wasserstoff würde mit dem in der Matrix

gelösten Sauerstoff in einer Knallgas-Reaktion verpuffen und die Zelle zerstören, weswegen die H-Atome an vorhandenes  $\text{NAD}^+$  binden und dieses zu NADH reduzieren. Acetyl-CoA tritt nun in den Citrat-Zyklus ein, indem es eine Bindung mit dem vier Kohlenstoffatome enthaltenden Oxalacetat eingeht, bei der erneut eine Reduktion von  $\text{NAD}^+$  stattfindet. Es entsteht Citrat (Zitronensäure), das sechs Kohlenstoffatome besitzt. Citrat wird decarboxyliert und  $\text{NAD}^+$  anschließend reduziert. Die dabei entstandene  $\alpha$ -Ketoglutarat wird durch wiederholte Reduktion von  $\text{NAD}^+$  und Decarboxylierung zu Succinat (Bernsteinsäure), aus dem über weitere Zwischenstufen wieder Oxalacetat gebildet wird. Das anfallende  $\text{CO}_2$  wird aus den Mitochondrien exportiert. Somit gehen aus der Umwandlung eines Pyruvat-Moleküls vier NADH-Moleküle hervor, die den nächsten Schritt bei der Energiegewinnung einleiten.

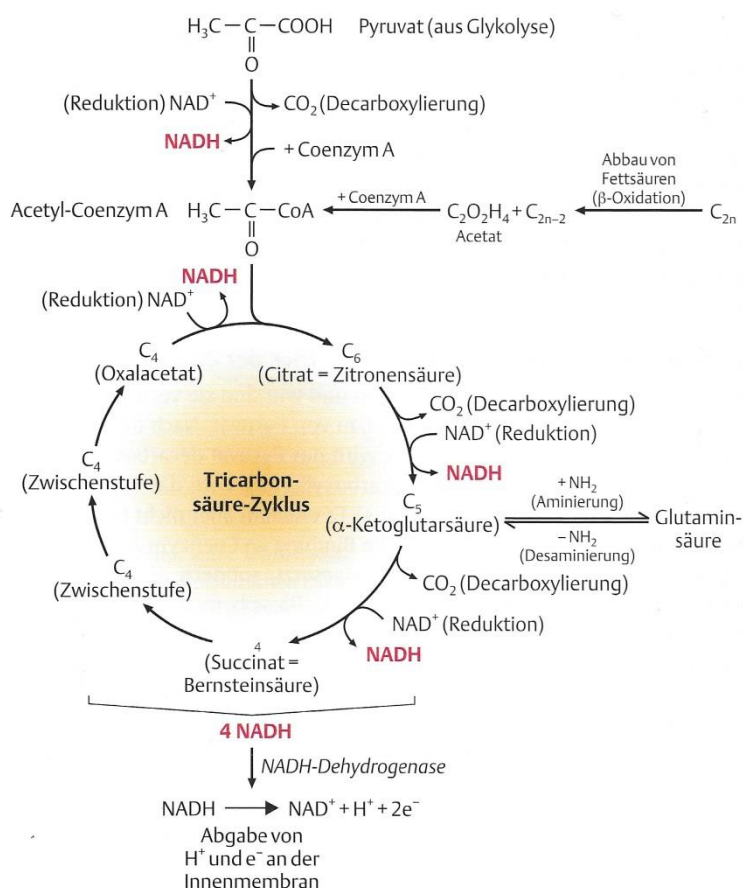


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Tricarbonsäure-Zyklus (Plattner und Hentschel 2011)

In der Cristae-Membran kommt es nun zur oxidativen Phosphorylierung, die auch Zellatmung genannt wird. Dargestellt ist dies in *Abbildung 3*. Gekoppelt an die

Verwertung von  $O_2$  wird ATP generiert. Die NADH-Dehydrogenase stellt das Ziel der in der Matrix befindlichen NADH-Moleküle dar. Sie oxidiert ein Molekül NADH zu  $NAD^+$ , einem Proton ( $H^+$ ) und einem Elektron ( $e^-$ ). Das Elektron wird von einem Cytochrom aufgenommen und in einer Kette von Cytochromen weitergegeben (Atmungskette). Cytochrome besitzen in ihrer Häm-Gruppe ein Eisenatom, das bei Eintritt eines Elektrons seine Wertigkeit von  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$  ändert und bei Abgabe eines Elektrons wieder zu  $Fe^{3+}$ . Der Elektronentransport durch die Atmungskette mündet in der Cytochromoxidase. Sie entlässt die Elektronen wieder in die Matrix und verknüpft diese zusammen mit Protonen und Sauerstoff zu Wasser ( $H_2O$ ). Der entscheidende Mechanismus der Atmungskette besteht im indirekten Transport von Protonen in den perimitochondrialen Spalt, da diese den Elektronen hinterherdiffundieren. Hierbei handelt es sich um eine chemo-osmotische Kopplung, bei der aus der Verarbeitung organischer Substrate osmotische Energie in Form eines Protonengradienten hervorgeht. Die Protonen sammeln sich im Intermembranraum an, da sie weder die Innenmembran in Richtung Matrix passieren können, noch durch die Cytochromoxidase gelangen. Der entstandene  $H^+$ -Gradient kann nur über den Transport der Protonen in die Matrix durch die ATP-Synthasen aufgelöst werden. Dieser Vorgang stellt eine osmo-chemische Kopplung dar, da die Aufhebung des Gradienten eine Substrat-Synthese bewirkt. Die ATP-Synthasen funktionieren wie eine Turbine, bei der die Protonen eine Art Rotor antreiben, der sich auf der Matrix-Seite befindet. Durch reversible Konformationsänderungen wandelt sich die Bewegungsenergie in chemische Energie um, die ATP aus ADP und  $P_i$  synthetisiert (Plattner und Hentschel 2011; Boujard et al. 2014).



Abbildung 3: Darstellung der oxidativen Phosphorylierung (Plattner und Hentschel 2011)

### 1.3. Bioenergetischer Gesundheitsindex

Der Bioenergetische Gesundheitsindex (*Bioenergetic Health Index - BHI*) gibt Auskunft über den Gesundheitszustand von Mitochondrien. Diese Beurteilung der mitochondrialen Bioenergetik kann als eine Art Frühwarnsystem des Körpers eingesetzt werden, da viele Erkrankungen mit Dysfunktionen der Mitochondrien einhergehen und inflammatorische Prozesse in Zellen des Immunsystems einen erhöhten Energiebedarf besitzen. Der BHI stellt somit einen Biomarker dar, der Erkenntnisse über mögliche Beschwerden oder Krankheiten dadurch liefern kann, dass das metabolische Potential der Zellen über ihre Mitochondrien bestimmt wird (König 2016).

Der Test der Mitochondrien erfolgt mithilfe chemischer Modulatoren, die Einfluss auf die Atmungskette nehmen. Gemessen wird die mitochondriale Atmung über die Sauerstoffverbrauchsrate (*Oxygen Consumption Rate – OCR*) während der aufeinanderfolgenden Zugabe dreier Substanzen zu den untersuchten Zellen. Zunächst gelangt Oligomycin in den perimitochondrialen Spalt und inhibiert dort die ATP-Synthase. Der angestaute Protonen-Gradient kann sich nicht auflösen und führt dazu, dass keine weiteren Elektronen durch die Cytochromkette transportiert werden. Die Cytochromoxidase arbeitet nicht und verbraucht keinen Sauerstoff; der OCR fällt ab. Anschließend erhalten die Zellen den Entkoppler FCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon), der in Lage ist, Protonen durch die mitochondriale Innenmembran zu schleusen. Die Protonen im Intermembranraum fließen in die Matrix und die Elektronentransportkette der Cytochrome wird wieder in Gang gesetzt. Die Cytochromoxidase läuft auf voller Kapazität, was zu einer Steigerung des OCR führt. Zuletzt werden die Zellen einer Mischung aus Rotenone und Antimycin A ausgesetzt. Rotenone inhibiert die NADH-Dehydrogenase und Antimycin A fungiert als Inhibitor des Komplex III der Cytochromkette. Die Zellatmung wird gestoppt und der OCR sinkt wieder.

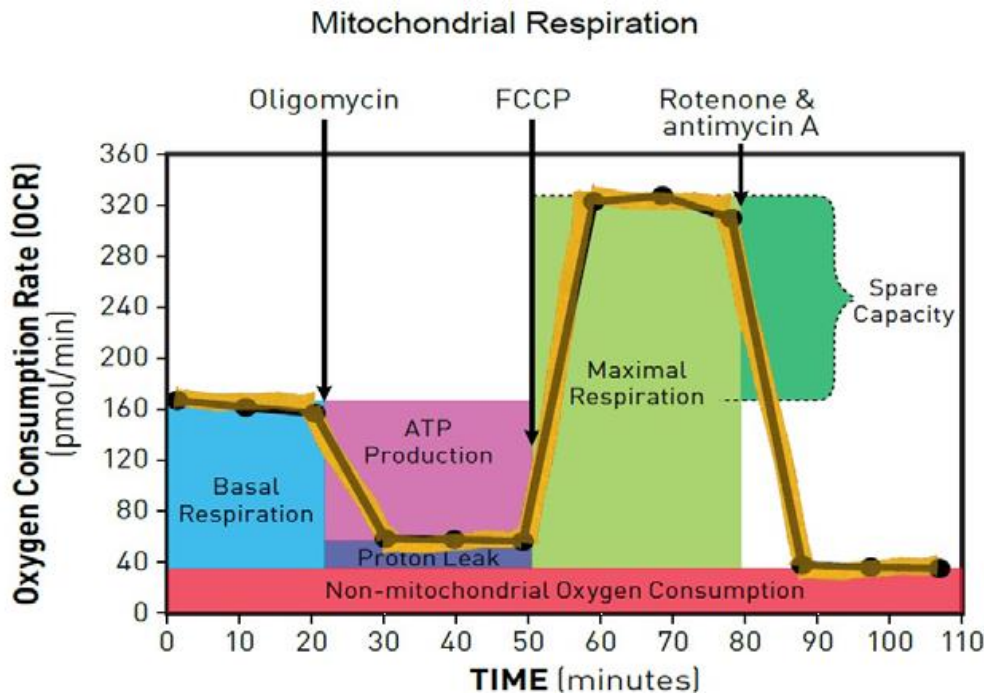


Abbildung 4: Modellverlauf der Oxygen Consumption Rate (OCR) über die Zeit (Agilent Technologies)

Wie in *Abbildung 4* zu sehen ist, ergibt sich ein Modellverlauf des OCR über die Zeit mit den markierten Punkten der Zugabe der Modulatoren. Anfangs wird ein Normalzustand der Zellen gemessen, den die Basalatmung (*Basal Respiration*) widerspiegelt. Sie gibt Auskunft über den Energiebedarf der Mitochondrien, der unter normalen Bedingungen gedeckt wird. Die zelleigene ATP-Produktion (*ATP Production*) kann als Differenz des OCR vor und nach der Inhibierung durch Oligomycin bestimmt werden. ATP-Produktion und Protonenleck (*Proton Leak*) ergeben zusammen die Basalatmung. Das Protonenleck steht hierbei für die Menge verbrauchter Elektronen, die ohne Produktion von ATP durch die Cytochromoxidase mit Sauerstoff umgesetzt werden. Der Anstieg des OCR über die Basalatmung hinaus nach Zugabe von FCCP führt zur Maximalatmung (*Maximal Respiration*), die das maximal mögliche Potential der mitochondrialen Atmung darstellt. Die Differenz zwischen Maximalatmung und ATP-Produktion bildet die Reserveatmungskapazität (*Spare Capacity*). Sie beschreibt die Fähigkeit der Mitochondrien, bei zusätzlicher Energieanforderung Energie bereitzustellen. Alle Prozesse der Zelle, die Sauerstoff nicht im Zuge der Energieproduktion verbrauchen werden als nicht-mitochondriale Atmung (*Non-mitochondrial Oxygen Consumption*) bezeichnet. Sie lässt sich durch den OCR nach Beendigung der Zellatmung bestimmen (Agilent Technologies).

Der BHI kann nun mit folgender Formel berechnet werden (Chacko et al. 2014):

$$BHI = \log \frac{\text{Reserveatmungskapazität} \times \text{ATP-Produktion}}{\text{nicht-mitochondriale Atmung} \times \text{Protonenleck}} \quad (1)$$

Ein niedriger BHI deutet auf eine mögliche Fehlfunktion der Mitochondrien hin, die sich durch eine geringe ATP-Produktion und Reserveatmungskapazität, sowie ein erhöhtes Protonenleck äußert. Im Gegensatz dazu steht ein hoher BHI für gesunde Mitochondrien mit einem guten metabolischen Potential.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

	<i>Hersteller</i>		<i>Artikelnummer</i>
<b>Pipetten</b>			
peqPETTE 1000E (100 – 1000 µl)	peqlab GmbH	Biotechnologie	103820032
peqPETTE 200E (20 – 200 µl)	peqlab GmbH	Biotechnologie	162330020
peqPETTE 10E (0,5 – 10 µl)	peqlab GmbH	Biotechnologie	48379
peqMATE	peqlab GmbH	Biotechnologie	103820032
SEROLOGICAL PIPETTE 5 ml und 10 ml	SARSTEDT		861253001 861254001
<b>Pipettenspitzen</b>			
Top-Line 100 – 1000 µl	AHN Biotechnologie GmbH		1-201-50-0
Top-Line 1 – 200 µl	AHN Biotechnologie GmbH		1-111-60-0
Top-Line 0,5 – 10 µl	SARSTEDT		70.1115
<b>Reaktionsgefäße/Zellkulturröhrchen</b>			
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG		0030120086
Reaktionstubes 50 ml (steril)	SARSTEDT		62.547.254
Reaktionstubes 15 ml (steril)	SARSTEDT		62.544.502

## Zellkulturflaschen

CELLSTAR	Greiner Bio-One	690175
Zellkulturflasche, 50ml, 25cm <sup>2</sup> , Filterschraubverschluss (T25-Flasche, rote Kappe)		
CELLSTAR	Greiner Bio-One	690195
Suspensionskulturflasche, 50ml, Filterschraubverschluss (T25-Flasche, weiße Kappe)		
CELLSTAR	Greiner Bio-One	658175
Zellkulturflasche, 250ml, 75cm <sup>2</sup> , Filterschraubverschluss (T75-Flasche, rote Kappe)		
CELLSTAR	Greiner Bio-One	658195
Suspensionskulturflasche, 250ml, Filterschraubverschluss (T75-Flasche, weiße Kappe)		

## Zählkammer

Cellometer	Counting	Nexcelom	91-CMCCP-01
Chambers		Bioscience/peqlab Biotechnologie GmbH	

## Seahorse

XFp Assay Cartridge	Seahorse Bioscience	103022-100
XFp Cell Culture Miniplate	Seahorse Bioscience	103025-100
XFp Cell Mito Stress Test Kit	Seahorse Bioscience	103010-100

## 2.2.Reagenzien und Medien

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnummer</i>
10xPBS-Lösung (40g/l NaCl; 7g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O; 1g/l KCl; 1g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	MMD Labor	
VE-H <sub>2</sub> O	MMD Labor	
RPMI Medium 1640 1x	gibco®	21875-034
RPMI 1640 Medium	MMD Labor	
2,5M D-Glucose	Roth	X997.2
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma Aldrich	P6407-5mg
Sodium Pyruvate 100mM (100x)	Gibco by Life Technologies	11360-039
Fetal Bovine Serum (FBS) performance plus	gibco®	10082- 147
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	gibco®	15140- 122
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	InvivoGen	tlrl-pma
Trypsin-EDTA (0,25%)	gibco®	25200- 072
Cellometer AO/PI Staining Solution in PBS	Nexcelom Bioscience/peqlab Biotechnologie GmbH	CS201065ML
Calibrant pH = 7,4 (100 ml-500 ml)	Seahorse Bioscience	100840-000

Das RPMI 1640 Medium muss vor der weiteren Benutzung mit den Zellen vorbereitet werden. Hierzu werden zwei verschiedene Medien angesetzt; RPMI-Mess und RPMI-KM. RPMI-Mess wird zum Waschen von Zellen und für Untersuchungen der Zellen genutzt, wohingegen RPMI-KM ein Komplettmedium darstellt und als Nährmedium für das Wachstum der Zellen dient. In der folgenden Tabelle ist die Herstellung der beiden Medien zu finden:

### *Medium*

RPMI-Mess

RPMI-KM

### *Zusammensetzung*

500ml RPMI 1640 Medium

+ 5ml 100mM Sodium Pyruvat

+ 2ml 2,5M D-Glucose

500ml RPMI 1649 Medium

+ 50ml FBS

+ 5ml Penicillin-Streptomycin

## 2.3.Geräte

### **Sicherheitswerkbenke**

SterilwerkbankHERA safe

SterilwerkbankHERA safe

### **Zentrifugen**

SorvallLynx 6000

PerfectSpin 24 R

### **Inkubatoren**

Inkubator mit CO<sub>2</sub>

Inkubator ohne CO<sub>2</sub>

### **Sonstige Geräte**

peqTWIST Vortex Mixer

Cellometer Vision

Seahorse XFp Analyzer

### *Hersteller*

Heraeus INSTRUMENTS

Heraeus INSTRUMENTS

Thermo Scientific

peqlab Biotechnologie GmbH

BINDER GmbH

Binder GmbH, APT.line TM ED (E2)

peqlab Biotechnologie GmbH

NexcelomBioscience

Agilent Technologies

### 2.3.1. *Cellometer Vision (Nexcelom Bioscience)*

Der *Cellometer Vision* ist ein Gerät der Firma *Nexcelom Bioscience*, mit dem Zellzählungen an einem angeschlossenen Computer vorgenommen werden können. Hierfür werden Zellzählkammern genutzt, von denen immer zwei auf einem vorgefertigten Objektträger liegen. Dieser wird in die Vorderseite des Gerätes gesteckt, sodass eine Zellzählkammer ausgelesen wird. Gefüllt wird jede Kammer mit 20 µl einer zuvor angesetzten Mischung aus 20µl Zellsuspension und 5µl AO/PI. AO/PI ist ein Reagenz, das aus Acridin Orange (AO) und Propidium Iodid (PI) besteht. AO generiert grüne Fluoreszenz und ist in der Lage, an Nucleinsäuren zu binden. Es diffundiert in lebende und tote Zellen und färbt jede Zelle mit einem Zellkern ein. PI bindet ebenfalls an Nucleinsäuren, ist aber im Gegensatz zu AO nicht membrandurchlässig. Nur tote Zellen, deren Zellmembran deformiert ist, nehmen das PI auf, welches dann an die DNA bindet. PI erzeugt rote Fluoreszenz (Mascotti et al. 2000). Über die Abtastung der Probe mit zwei unterschiedlichen Kameras hintereinander werden alle lebenden (grün) und toten Zellen (rot) gezählt. Das zum *Cellometer Vision* gehörige Computerprogramm erfordert die Eingabe des zu untersuchenden Zelltyps und eines Verdünnungsfaktors, der sich aus dem zugegebenen Volumen in der Zellkammer geteilt durch das dafür eingesetzte Volumen der Zellsuspension ergibt. Werden die 20µl unverdünnt aus einer Zellsuspension genommen, ergibt sich somit ein Faktor von 1,25. Neben der Anzahl lebender und toter Zellen gibt das Programm auch die Viabilität, den durchschnittlichen Durchmesser der Zellen sowie die Zellkonzentration je ml an. Abschließend kann das Programm bei Bedarf berechnen, inwiefern das Volumen der Zellsuspension, aus dem die Probe entnommen wurde, eingestellt werden muss, um eine gewünschte Zellkonzentration je ml zu erhalten.

### **2.3.2. Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies)**

Bei dem *Seahorse XFp Analyzer* der Firma *Agilent Technologies* handelt es sich um einen *Extracellular Flux Analyzer*, der Veränderungen von Zellen detektiert. Das Gerät injiziert verschiedene Reagenzien hintereinander in ein Medium, in dem sich Zellen befinden. Die Reaktionen der Zellen auf die Reagenzien werden über die Veränderung der Sauerstoffkonzentration (*Oxygen Consumption Rate, OCR*), der extrazellulären Ansäuerungsrate (*Extracellular Acidification Rate, ECAR*) und des pH-Wertes im Medium gemessen. Zur Verfügung stehen mehrere Kits des Herstellers für verschiedene Fragestellungen. Mit Hilfe des *XFp Cell Mito Stress Test Kit* kann die mitochondriale Atmung untersucht werden. Die funktionale Messung der Mitochondrien lässt Aussagen über die Zellen zu zellulärer Aktivität, Proliferation, Differenzierung und Dysfunktion zu. Oligomycin, FCCP und eine Mischung aus Rotenone und Antimycin A werden als Reagenzien eingesetzt und agieren als Inhibitoren mehrerer Komplexe der Atmungskette. Gemessen werden über die *Oxygen Consumption Rate (OCR)* die ATP-Produktion, die maximale Atmung und die nicht-mitochondriale Atmung. Hieraus werden anschließend noch die Basalatmung, das Protonenleck und die Reserveatmungskapazität bestimmt.

### **2.4. Vorbereitungen für Untersuchungen von Zellen im Seahorse**

Um Versuche mit dem *Seahorse* durchzuführen müssen bereits einen Tag zuvor Vorbereitungen getroffen werden. Standardmäßig werden für alle Untersuchungen mit dem *XFp Cell Mito Stress Test Kit* zwei mitgelieferte Materialien eingesetzt; eine Mikrokulturplatte mit Deckel für die zu untersuchenden Zellen und eine Cartridge für die Injektion der gewünschten Reagenzien. Die Mikrokulturplatte besteht aus acht länglichen Vertiefungen außen, Mouts genannt, und acht runden Wells in der Mitte. Die Wells werden mit je 25µl Poly-D-Lysin (PDL) befüllt. PDL ist eine synthetische Verbindung zur Förderung der Zelladhäsion. Die Platten werden zwecks Beschichtung mit PDL für 1-2 Stunden inkubiert. Anschließend werden alle Wells mit einer Pipette geleert und mit je 500µl autoklaviertem VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach bleibt die Platte zum Trocknen für mindestens eine Stunde oder alternativ über Nacht

offen stehen. Die Cartridge besteht ebenfalls aus einer Platte mit je acht Wells und Mouts sowie einem sensorischen Aufsatz für die Reagenzien und einem Deckel. In jedes Well werden 200µl Calibrant und in die einzelnen Mouts 400µl Calibrant gegeben. Calibrant dient der Kalibrierung der Sensoren im *Seahorse* vor jedem Test. Die befüllten Mouts wirken der Verdampfung der Flüssigkeit in den Wells entgegen. Das Calibrant in den Wells befeuchtet außerdem die Sensoren im Aufsatz (Hydratisierung). Die Cartridge wird anschließend über Nacht in einen Inkubator gestellt (37°C, ohne CO<sub>2</sub>).

Die hydratisierte Cartridge wird am nächsten Tag mit den einzusetzenden Reagenzien befüllt. Für den Mito Stress Test werden dem mitgelieferten Kit die drei Tubes mit Oligomycin, FCCP und Rotenone/Antimycin A entnommen. Entsprechend der nachfolgenden Tabelle werden die als Pulver vorliegenden Substanzen in RPMI-Mess gelöst, um stabile Stocklösungen herzustellen.

*Tabelle 1: Stocklösungen*

	Lösungsvolumen	Konzentration
Oligomycin	252µl	50µM
FCCP	288µl	50µM
Rotenone/Antimycin A	216µl	25µM

Aus den Stocklösungen werden mit RPMI-Mess nun verdünnte Arbeitslösungen hergestellt, die nur begrenzt stabil sind. In Tabelle 2 ist das Pipettierschema dargestellt.

*Tabelle 2: Arbeitslösungen*

	Stockvolumen	Lösungsvolumen	Konzentration
Oligomycin	120µl	180µl	20µM
FCCP	90µl	210µl	15µM
Rotenone/Antimycin A	100µl	150µl	10µM

Der Sensoraufsatz der Cartridge besitzt für jedes Well vier Ports, die mit A, B, C und D beschriftet sind. In jeden Port wird ein Reagenz pipettiert, sodass später alle drei Reagenzien in jedes einzelne Well injiziert werden können; Port D bleibt dabei leer.

*Tabelle 3: Befüllung Sensor*

	Port	Volumen	Konzentration je Well
Oligomycin	A	20µl	2,0µM
FCCP	B	22µl	1,5µM
Rotenone/Antimycin A	C	25µl	1µM

Die Konzentrationen je Well ergeben sich aus den Volumina der Reagenzien, die während des Tests im *Seahorse* zu den sich im Medium befindlichen Zellen hinzugegeben werden. Im Folgenden sei dies an einem Beispiel erklärt: In jedem Well befinden sich 180µl Zellsuspension, zu der Oligomycin injiziert werden soll, sodass die Endkonzentration von Oligomycin in der Zellsuspension 2,0µM beträgt. Dies entspricht einem Zehntel der Konzentration der Arbeitslösung von Oligomycin. Folglich stellen die 180µl Zellsuspension 90% des Gesamtvolumens dar.

$$\frac{180\mu l}{90\%} \times 100\% = 200\mu l \quad (2)$$

Demzufolge beträgt das Injektionsvolumen von Oligomycin 20µl, die aus der Arbeitslösung entnommen werden. Für FCCP und Rotenone/Antimycin A erfolgt die Berechnung analog, wobei beachtet werden muss, dass die Reagenzien nacheinander injiziert werden, sodass das Gesamtvolumen stetig ansteigt.

Die fertig vorbereitete Cartridge wird ohne Deckel in den *Seahorse* gestellt und das Programm für den Mito Stress Test gestartet. Nach der ca. 20-minütigen Kalibrierung wird der Sensoraufsatz mit den Reagenzien im Gerät zurückgehalten und nur die untere Platte wird ausgegeben. Diese wird entnommen und gegen die Mikrokulturplatte mit den Zellen ausgetauscht. Der *Seahorse* startet daraufhin den eigentlichen Test. Alle vom Gerät gemessenen Werte werden automatisch in einer Excel-Datei gespeichert, die dann am Computer weiter verarbeitet werden kann.

## 2.5. Anzucht von Zellen aus der Kryokultur

Aus dem im Labor befindlichen Stickstofftank wurden zwei Kryotubes mit je 1ml THP-1-Zellen entnommen, deren Zellkonzentration  $5 \times 10^6$  Zellen/ml beträgt. In jedes Tube werden 1ml RPMI-KM gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren werden die Zellsuspensionen homogenisiert, bevor sie in 15ml Tubes überführt und dann bis auf 15ml mit RPMI-KM aufgefüllt werden. Bei 300xg wird für fünf Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Zum Waschen werden die Pellets in 1ml PBS resuspendiert und auf 15ml mit PBS aufgefüllt. Erneut wird für fünf Minuten bei 300xg zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Die Überstände werden verworfen, die Pellets in 1ml RPMI-KM resuspendiert und dann auf 5ml mit RPMI-KM aufgefüllt. Nun erfolgt eine Zellzählung mittels AO/PI-Färbung im *Cellometer Vision*. Die Zellzahlkonzentrationen in den beiden T25-Flaschen (weiße Kappen; jeweils 10 ml Volumen) werden auf je  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Um das Wachstum der Zellen nach dem Auftauen zu unterstützen wird 1ml Fetal Bovine Serum (FBS; Endkonzentration 10%) zu jeder Flasche gegeben. Bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren die Zellen im Brutschrank.

Nach 48 Stunden wird ein Wechsel des Mediums vorgenommen. Die Zellsuspensionen der beiden T25-Flaschen werden in einem 50ml Tube gepoolt und bei 250xg für zehn Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen (s. o.). Nach dem Resuspendieren mit 1ml RPMI-KM werden die Zellen auf 5ml aufgefüllt und mittels AO/PI-Färbung im *Cellometer Vision* gezählt. Die Zellzahl wird auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und das Volumen in eine T75-Flasche (weiße Kappe) überführt. Die Flasche wird bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt. Nach 72 Stunden sind die Zellen ausreichend gewachsen, damit mit ihnen gearbeitet werden kann.

## 2.6. Kultivierung und Pflege der Zellen

Die THP-1-Zellen wachsen stets in T75-Flaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Einmal pro Woche (Freitag) werden die Zellen gewaschen und in neuem Medium resuspendiert. Hierfür wird das gesamte Volumen einer T75-Flasche (ca. 40ml) in eine 50ml Tube gefüllt und bei 250xg für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1ml PBS aufgenommen. Nach dem Auffüllen mit PBS auf 10ml wird erneut für zehn Minuten bei 250xg zentrifugiert. Der Waschschrift wird wiederholt. Der Überstand wird wieder verworfen, das Pellet in 1ml RPMI-KM resuspendiert und auf 10ml aufgefüllt. Die Zellzahl wird mittels AO/PI-Färbung im *Cellometer Vision* bestimmt und auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden dann in die T75-Flasche (20ml) gefüllt. Auf die Flasche wird die Nummer der Passage und das Datum geschrieben, damit nachvollzogen werden kann, aus welcher Passage die Zellen stammen, mit denen gearbeitet wurde. An zwei weiteren Tagen in der Woche (Montag und Mittwoch) werden je 10ml RPMI-KM zu den Zellen in die T75-Flasche gegeben, um die Zellen zu füttern. Eine T75-Flasche wird stets als Erhaltung mitgeführt, während bei Bedarf für anstehende Untersuchungen wie der Stimulation der Zellen eine extra T75-Flasche während des Passagierens angesetzt wird.

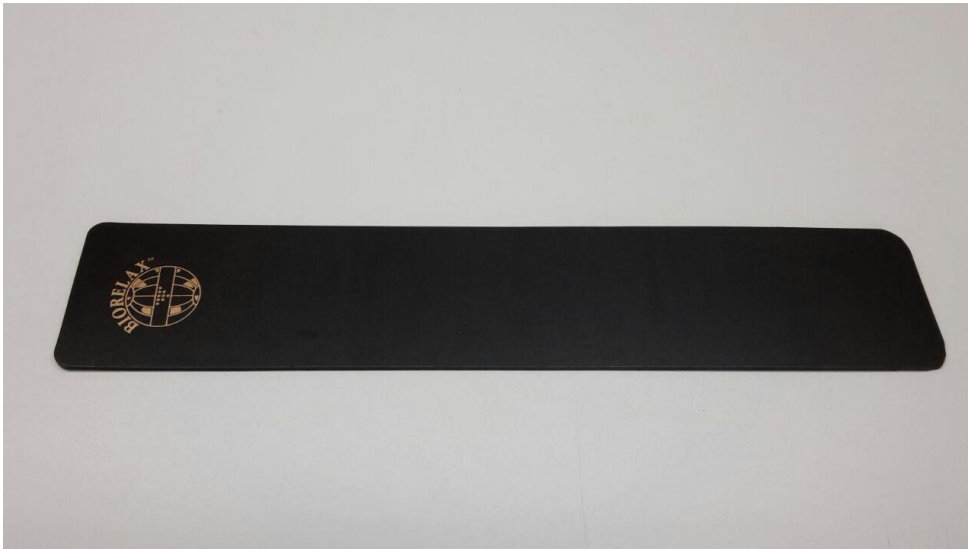
THP-1-Zellen, die mit Hilfe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu adhärenenten Zellen ausdifferenziert werden, benötigen eine gewisse Vorlaufzeit, bevor mit ihnen gearbeitet werden kann. Während des wöchentlichen Mediumwechsels wird eine für adhärenente Zellen geeignete T75-Flasche (rote Kappe) angesetzt. Sie besitzt eine extra Beschichtung, die das Anheften der Zellen unterstützt. Nach der Zellzahlbestimmung werden die Zellen mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI-KM aufgenommen, sodass sich in der Flasche ein Gesamtvolumen von ungefähr 30ml befindet. Dieses Volumen setzt sich aus den gewaschenen und in RPMI-KM aufgenommenen Zellen, zusätzlichem RPMI-KM und dem anzusetzenden PMA zusammen. Das aliquotierte und bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagerte PMA (5mg/ml) muss verdünnt werden, bevor es zu den Zellen gegeben werden kann; andernfalls wäre die Dosierung zu hoch und die Zellen würden zu stark vorstimuliert werden oder würden sogar sterben. Nachfolgend ist die PMA-Verdünnungsreihe dargestellt:

<i>Verdünnung 1:</i>	$10\mu\text{l PMA} + 90\mu\text{l RPMI} - \text{KM}$
<i>Verdünnung 2:</i>	$50\mu\text{l Verd. 1} + 450\mu\text{l RPMI} - \text{KM}$
<i>Verdünnung 3:</i>	$50\mu\text{l Verd. 2} + 450\mu\text{l RPMI} - \text{KM}$
<i>Verdünnung 4:</i>	$100\mu\text{l Verd. 3} + 900\mu\text{l RPMI} - \text{KM}$

Allgemein kommen auf 10ml Medium 100µl PMA der Verdünnung 4 (5ng/ml). In die T75-Flasche wird das RPMI-KM vorgelegt, ehe die entsprechende Menge PMA (ca. 300µl) hinzugegeben wird. Die Suspension wird durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken homogenisiert. Danach werden die Zellen hinzugegeben. Die fertige Flasche wird mit „PMA-Zellen“ und dem Datum des Ansetzens beschriftet und in den Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelegt.

## 2.7. Stimulation der Zellen mit Magnetstreifen

Die Stimulation der Zellen erfolgte auf einer selbst gebauten Vorrichtung mit einem speziellen Magnetstreifen der Firma *BIORELAX* bzw. einem Mock-Magnetstreifen, der in *Abbildung 5* zu sehen ist. Die Magnetstreifen bestehen aus sich ständig abwechselnden Positiv- und Negativpolen. Durch eine kontinuierliche Hin- und Herbewegung der Magnetstreifen unter den Zellen werden Kleinsche Felder induziert, die zur Stimulierung der Zellen genutzt wurden. Die Vorrichtung besteht aus zwei sich bewegenden Streifen, von denen nur einer die Magnetfelder erzeugt, während der andere Streifen (Mock-Magnetstreifen) keinerlei Wirkung hat und als Negativkontrolle (NTC) mitgeführt wurde. Über den Streifen befindet sich jeweils eine kleine arretierte Metallplatte, auf der die T25-Flaschen mit den zu untersuchenden Zellen gelegt wurden. Die gesamte Vorrichtung befindet sich im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) und ist mit einem Faden mit einem außerhalb des Inkubators stehenden Motor verbunden. Dieser dreht sich, wodurch der Faden hin- und hergezogen wird und die beiden Streifen im Inkubator unter der Metallplatte bewegt.



*Abbildung 5: Magnetstreifen der Firma BIORELAX*

Da sowohl THP-1- als auch PMA-differenzierte Zellen in T75-Flaschen wachsen, müssen die Zellen für die Versuche gewaschen, gezählt und in T25-Flaschen überführt werden. Grund ist die begrenzte Fläche der Metallplatte, die durch die Bewegung der Streifen abgedeckt werden kann. Das Waschen der Zellen erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie beim Passagieren. Nach der Zellzahlbestimmung werden zwei T25-Flaschen (5-10ml) mit einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt. Eine Flasche wird mit „NTC“ und die andere mit „Stimulation“ beschriftet. Dann werden die Flaschen über die entsprechenden Streifen (Mock-Magnetstreifen bzw. Magnetstreifen) auf die Metallplatte gelegt und die Stimulation wird gestartet.

Die PMA-differenzierten Zellen wurden dienstags untersucht. Nachdem die Zellen übers Wochenende differenziert wurden, erfolgte am Montag das erste Ernten der Zellen. Hierbei werden die Zellen aus der T75-Flasche entnommen, gewaschen und auf zwei T25-Flaschen (rote Kappe) aufgeteilt. Da sich die Zellen am Boden der Flasche angeheftet haben, wird zuerst vorsichtig das gesamte Medium über die nicht bewachsene Seite der Flasche abgegossen und verworfen. Dann werden 5ml PBS langsam in die Flasche gegeben. Die Flasche wird etwas geschwenkt, um noch eventuell vorhandenes Medium abzuspülen. Das PBS wird anschließend verworfen. Nun werden 2ml Trypsin in die Flasche pipettiert, um die Zellen vom Boden abzulösen. Die Flasche wird für fünf Minuten in den Inkubator gelegt, wobei beachtet werden muss, dass der Boden vollständig mit Trypsin bedeckt ist. Nach der

Inkubation wird die Flasche mit einer Hand festgehalten und mehrmals kräftig gegen die andere Hand geklopft. Die sich ablösenden Zellen sind als kleine weiße Klümpchen zu erkennen. Da das Trypsin bei längerer Einwirkung eine Schädigung der Zellen hervorrufen würde, werden 10ml RPMI-KM zur Inhibierung der Trypsinwirkung nach spätestens zehn Minuten in die Flasche gegeben. Mittels einer 10ml-Plastikpipette werden die Innenwände der Flasche mit dem RPMI-KM gespült, bevor die Zellsuspension aufgenommen und in ein 15ml Tube überführt wird. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 250xg werden die Zellen analog zu den THP-1-Zellen mit PBS gewaschen (s. o.). Anschließend werden die Zellen in 10ml RPMI-KM aufgenommen und im *Cellometer Vision* gezählt. Die Zellzahl wird auf  $3 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. In die T25-Flaschen kommt ein Gesamtvolumen von 5ml, sodass sich die PMA-differenzierten Zellen anheften können. Über Nacht wachsen die Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Am nächsten Tag können die beiden Flaschen dann auf die Vorrichtung zur Stimulation mit dem Magneten gelegt werden.

## 2.8. Aufarbeitung der Zellen für Untersuchungen im Seahorse

Nach der Stimulation auf dem Magnetstreifen bzw. dem Mock-Magnetstreifen werden die in den T25-Flaschen befindlichen THP-1-Zellen wieder gewaschen. Die Zentrifugationsbedingungen bleiben gleich; der Ablauf ändert sich nur dahingehend, dass kein PBS zum Waschen verwendet wird sondern RPMI-Mess. Die Zellzahl wird im *Cellometer Vision* ermittelt und für die Untersuchung im *Seahorse* auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die PMA-differenzierten Zellen werden zum Ernten wieder mit Trypsin behandelt (s. o.) und ebenfalls mit RPMI-Mess gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung wird eine Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt.

Nun erfolgt die Überführung der stimulierten Zellen und der unstimulierten Zellen (NTC) in die Mikrokulturplatte. Die acht Wells sind mit A – H beschriftet. Die Wells A und H werden als Blank mitgeführt und enthalten keine Zellen. Sie werden mit 100µl RPMI-Mess befüllt. In die Wells B, C und D werden jeweils 100µl Zellsuspension der stimulierten Zellen gegeben. Von der Negativkontrolle werden je 100µl in die Wells E, F und G pipettiert. Die Mouts werden mit je 400µl VE-H<sub>2</sub>O befüllt, um während der

Untersuchung im *Seahorse* eine Verdunstung der Zellsuspensionen zu verhindern. Dann wird die Mikrokulturplatte für fünf Minuten bei 300xg zentrifugiert, damit sich die Zellen möglichst gleichmäßig am Boden der Wells verteilen. Dies wird anschließend durch eine Betrachtung der Wells unter dem Mikroskop beurteilt, wobei zu notieren ist, ob die Zellen homogen oder inhomogen verteilt sind und wie groß die Konfluenz ist. Nun wird jedem Well 80µl RPMI-Mess hinzugefügt. Anschließend kann die Mikrokulturplatte in den vorbereiteten und kalibrierten *Seahorse* gestellt werden und die Untersuchung gestartet werden.

Auf eine statistische Betrachtung der Ergebnisse aller Untersuchungen wurde verzichtet, da jeder Versuch innerhalb dieses Pilotprojektes nur einmal durchgeführt wurde.

### 3. Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuchsläufe mit den THP-1-Suspensionszellen und den PMA-differenzierten THP-1-Zellen dargestellt. Für beide Zelltypen erfolgte vor der Stimulation der Zellen auf dem Magnetstreifen bzw. dem Mock-Magnetstreifen ein Vorversuch zur Betrachtung des Ist-Zustandes der Zellen. Die THP-1-Zellen wurden beiden Magnetstreifen für eine, vier, acht und 24 Stunden ausgesetzt; die PMA-differenzierten Zellen wurden eine, vier und 24 Stunden lang stimuliert.

#### 3.1. THP-1-Zellen

##### 3.1.1. Vorversuch

Vor der Stimulation mit dem Magnetstreifen wurden die THP-1-Zellen in der Passage 18 im Seahorse getestet, um herauszufinden, wie sich die Zellen unter den Kultivierungsbedingungen verhalten. Im Folgenden ist für die mitochondriale Atmung die *Oxygen Consumption Rate (OCR)* gegen die Zeit in Fünffachbestimmung aufgetragen.

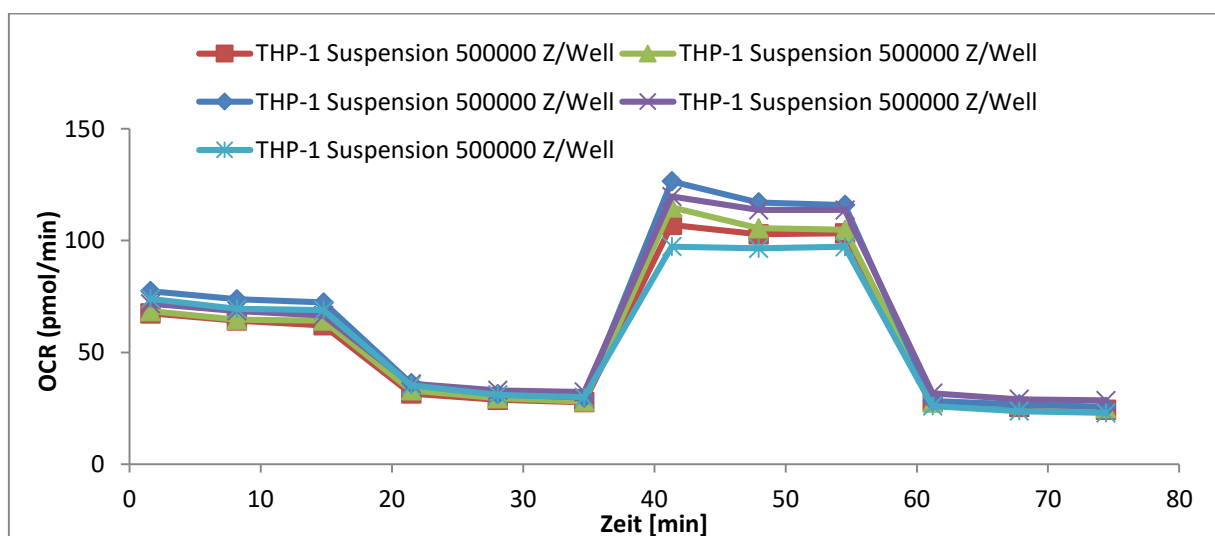


Abbildung 6: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min

Die daraus resultierenden Werte der Basalatmung, des Protonenlecks, der Maximalatmung, der Reserveatmungskapazität, der nicht-mitochondrialen Atmung und der mitochondrialen ATP-Produktion sind mit den Mittelwerten, den Standardabweichungen und den Variationskoeffizienten in der *Tabelle 4* und den *Abbildung 7* und *8* zu sehen.

Die Zellen in den fünf getesteten Wells (C – G) zeigen alle sehr ähnliche Verläufe des OCR, die nur im Bereich zwischen 40 und 55 Minuten, also nach der Zugabe von FCCP, geringfügig voneinander abweichen.

*Tabelle 4: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min*

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	Well C	37,73	3,42	82,75	45,01	24,32	34,31
	Well D	39,18	2,98	89,82	50,63	25,01	36,21
	Well E	46,67	4,12	100,88	54,20	25,66	42,55
	Well F	37,99	3,80	91,22	53,23	28,50	34,18
	Well G	45,92	6,97	74,34	28,42	22,94	38,95
Mittelwert		41,50	4,26	87,80	46,30	25,29	37,24
Standard- abweichung		4,42	1,58	9,92	10,61	2,06	3,54
Variationsko- effizient		10,65%	37,09%	11,30%	22,92%	8,15%	9,51%

Die Standardabweichung des Protonenlecks ist im Vergleich zu den anderen Größen am geringsten, weist aber aufgrund des niedrigen Mittelwertes den höchsten Variationskoeffizienten auf. Dies lässt sich auch in *Abbildung 7* erkennen, da beim Protonenleck Well G (türkise Säule) sichtbar von den anderen vier Wells abweicht und teils doppelt so hohe Werte annimmt wie die übrigen Wells. Ein ähnlicher Effekt ist ebenfalls durch Well G bei der Reserveatmungskapazität zu beobachten. Der Wert von 28,42 pmol/min weicht deutlich von denen der anderen Wells ab. Mit 22,92% ist hier der zweithöchste Variationskoeffizient zu verzeichnen. Nicht-

mitochondriale Atmung, mitochondriale ATP-Produktion, Basalatmung und Maximalatmung liegen mit Variationskoeffizienten zwischen 8,15% und 11,30% dicht beieinander.

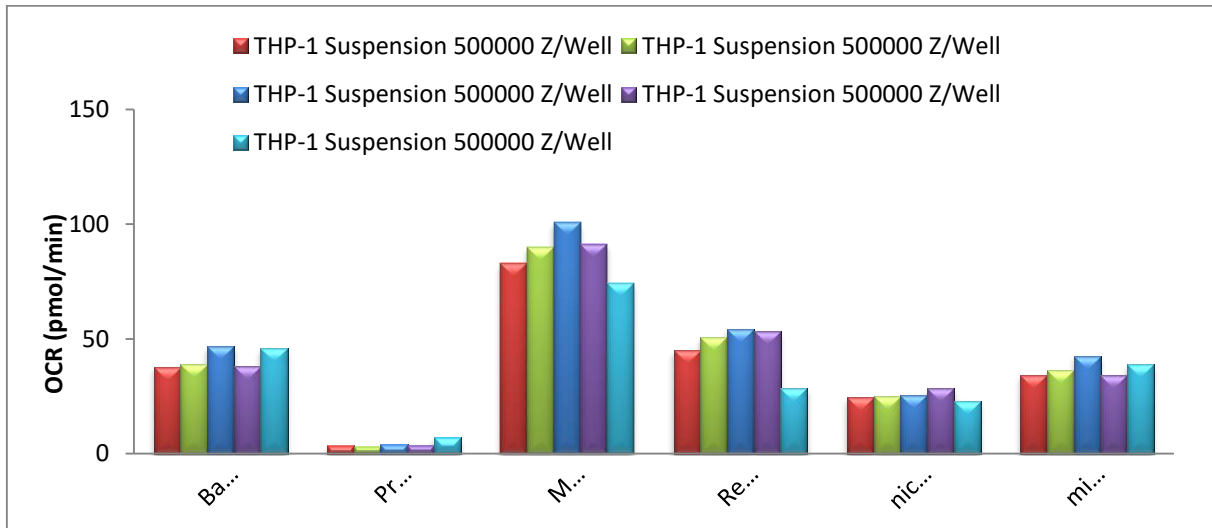


Abbildung 7: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion (dargestellt sind die fünf Einzelergebnisse in pmol O<sub>2</sub>/min)

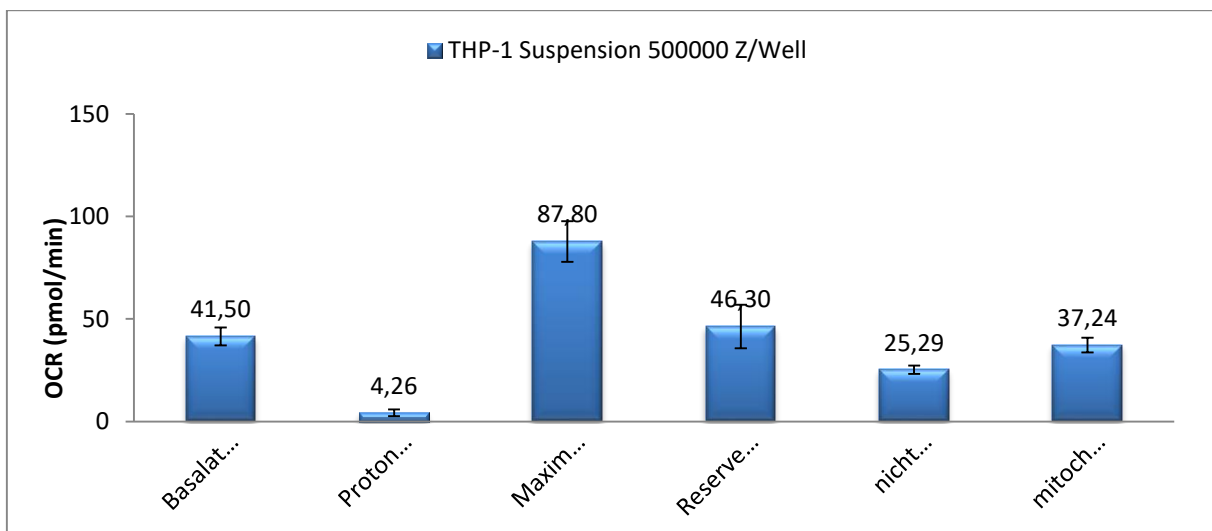


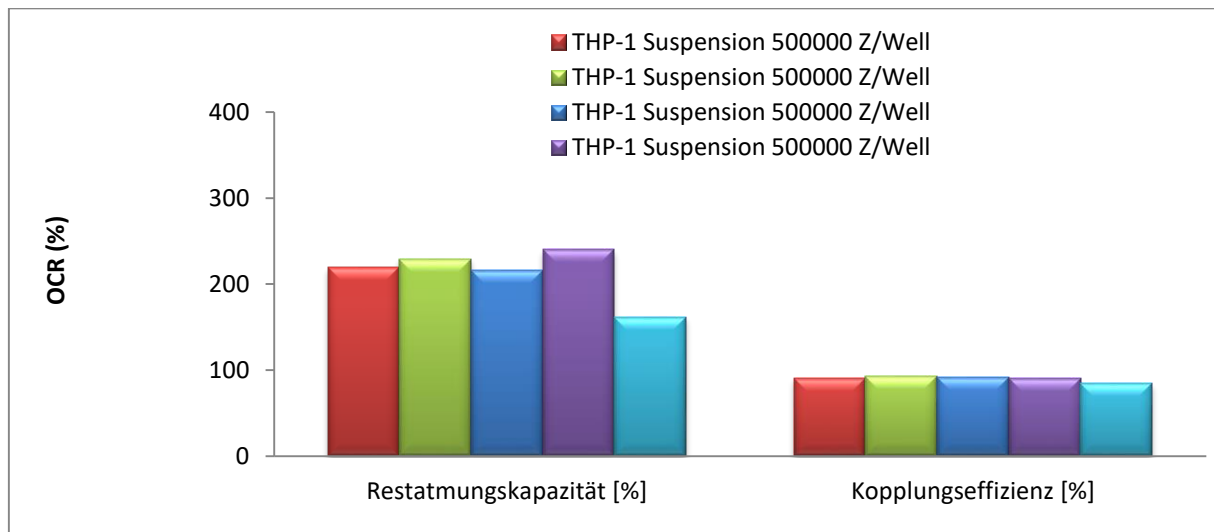
Abbildung 8: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion

Die prozentuale Reserveatmungskapazität und die Kopplungseffizienz sind tabellarisch und graphisch nachfolgend dargestellt.

**Tabelle 5: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	Well C	219,30	90,93
	Well D	229,21	92,40
	Well E	216,14	91,16
	Well F	240,14	89,99
	Well G	161,89	84,81
Mittelwert		213,34	89,86
Standardabweichung		30,25	2,95
Variationskoeffizient		14,18%	3,28%

Die Werte der Kopplungseffizienz sind für alle fünf Wells sehr homogen verteilt, was auch der niedrige Variationskoeffizient von 3,28% widerspiegelt. Bei der Reserveatmungskapazität liegt der Variationskoeffizient bei 14,18%, was durch den sichtbar geringeren Wert des Wells G (s. *Abbildung 9*, türkise Säule) bedingt ist.



**Abbildung 9: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

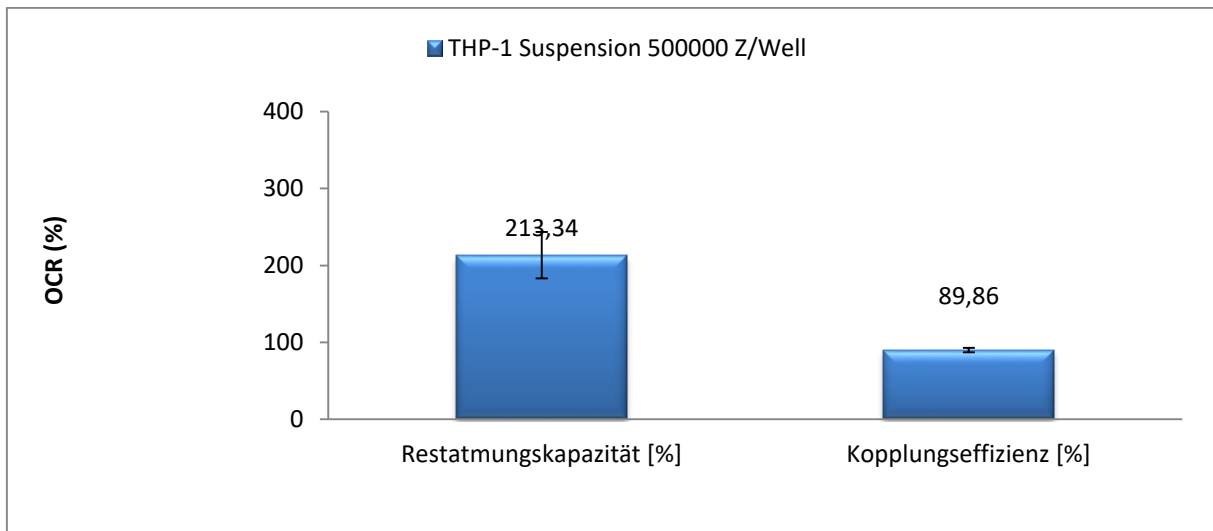


Abbildung 10: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Der Bioenergetische Gesundheitsindex ist in der folgenden Tabelle zu finden.

Tabelle 6: Vorversuch mit THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)

		BHI
	Well C	1,27
	Well D	1,39
	Well E	1,34
	Well F	1,22
	Well G	0,84
Mittelwert		1,21
Standardabweichung		0,22
Variationskoeffizient		18,18%

Mit Werten zwischen 1,22 und 1,39 liegt der BHI der Wells C bis F nah beieinander. Well G stellt mit einem BHI von 0,84 einen Ausreißer dar, der den erhöhten Variationskoeffizienten von 18,18% bewirkt.

### 3.1.2. 1h Stimulation

Nach einer Stunde Stimulation der Zellen mit dem Magnetstreifen bzw. dem Mock-Magnetstreifen (NTC) ergab sich für die mitochondriale Atmung folgender Verlauf:

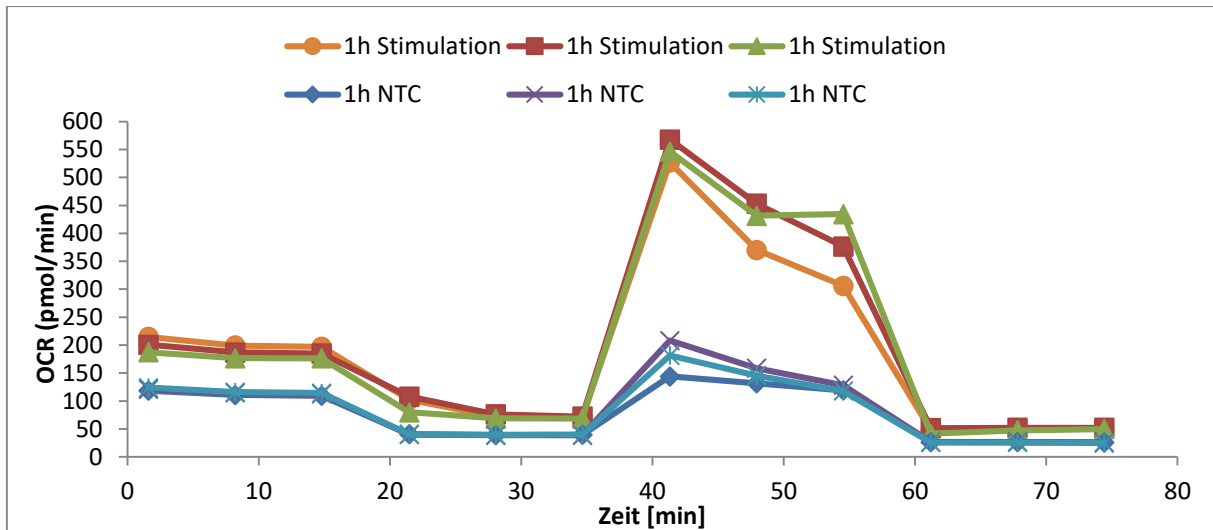


Abbildung 11: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min

Der OCR der stimulierten Zellen (Well B – D) weist durchgehend höhere Werte als die zur Kontrolle mitgeführten Zellen auf dem Mock-Magnetstreifen (NTC) (Well E – G) auf.

Die errechneten Größen der mitochondrialen Atmung sind in *Tabelle 7* zu finden.

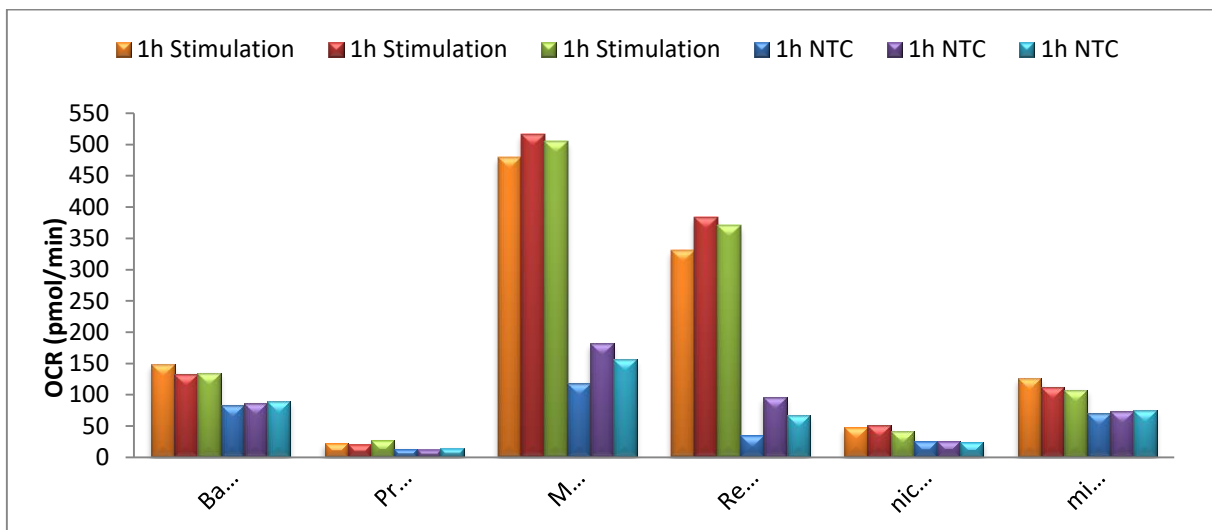
*Tabelle 7: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min*

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	1h Stimulation	148,87	22,61	478,89	330,02	48,17	126,26
	1h Stimulation	133,43	20,65	516,47	383,04	51,54	112,78
	1h Stimulation	134,90	27,13	504,81	369,92	41,52	107,77
	1h NTC	83,64	13,55	118,37	34,73	25,56	70,09
	1h NTC	86,63	12,49	182,04	95,41	26,08	74,13
	1h NTC	89,42	14,58	156,66	67,24	24,83	74,84
<hr/>							
Mittelwert		139,06	23,46	500,06	360,99	47,08	115,60
Standard- abweichung	1h Stimulation	8,52	3,32	19,24	27,62	5,10	9,56
Variationsko- effizient		6,13%	14,15%	3,85%	7,65%	10,84%	8,27%
<hr/>							
Mittelwert		86,56	13,54	152,36	65,79	25,49	73,02
Standard- abweichung	1h NTC	2,89	1,04	32,06	30,37	0,63	2,56
Variationsko- effizient		3,34%	7,69%	21,04%	46,16%	2,47%	3,51%

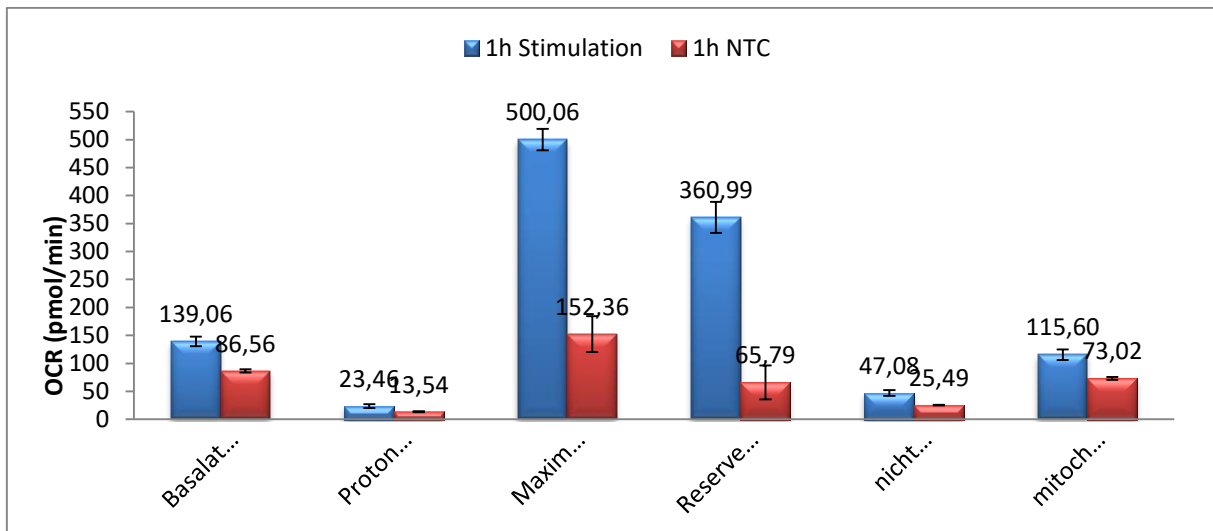
Bei den stimulierten Zellen weisen das Protonenleck und die nicht-mitochondriale Atmung mit 3,32 bzw. 5,10 die geringsten Standardabweichungen auf. Wegen der vergleichsweise niedrigen Mittelwerte besitzen sie jedoch mit 14,15% bzw. 10,84% die beiden höchsten Variationskoeffizienten. Die Maximalatmung der stimulierten Zellen ergibt trotz der zweithöchsten Standardabweichung (19,24) den geringsten Variationskoeffizienten (3,85%), bedingt durch den hohen Mittelwert von 500,06. Basalatmung, Reserveatmungskapazität und mitochondriale ATP-Produktion liegen

mit Variationskoeffizienten zwischen 6,13% und 8,27% dicht beieinander. Die Negativkontrolle liefert für die nicht-mitochondriale Atmung, die Basalatmung und die mitochondriale ATP-Produktion sehr niedrige Variationskoeffizienten zwischen 2,47% und 3,51%. Mit den hohen Standardabweichungen von 32,06% bzw. 30,37% der Maximalatmung und der Reserveatmungskapazität gehen hohe Variationskoeffizienten von 21,04% bzw. 46,16% einher. Auffällig sind hierbei die vergleichsweise geringen Werte von Well E, die in *Abbildung 12* deutlich zu erkennen sind (blaue Säule).

Die *Abbildungen 12* und *13* zeigen die graphische Auftragung der Größen aus *Tabelle 7*.



*Abbildung 12: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min*



**Abbildung 13: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatemungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion**

Wie zuvor beim Verlauf der mitochondrialen Atmung in *Abbildung 11* ist in *Abbildung 13* für alle Größen deutlich zu sehen, dass die stimulierten Zellen im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen höhere Werte aufweisen. Die *Tabelle 8* sowie die *Abbildungen 14* und *15* zeigen die Reserveatemungskapazität und die Kopplungseffizienz in Prozent mit den jeweiligen Mittelwerten und Standardabweichungen sowie den Variationskoeffizienten.

**Tabelle 8: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatemungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

		Reserveatemungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	1h Stimulation	321,68	84,81
	1h Stimulation	387,08	84,52
	1h Stimulation	374,22	79,89
	1h NTC	141,52	83,80
	1h NTC	210,14	85,58
	1h NTC	175,20	83,70
<hr/>			
Mittelwert		361,00	83,08
Standardabweichung	1h Stimulation	34,65	2,76
Variationskoeffizient		9,60%	3,32%
<hr/>			
Mittelwert		175,62	84,36
Standardabweichung	1h NTC	34,31	1,06
Variationskoeffizient		19,54%	1,25%

Sowohl bei den stimulierten als auch bei den unstimulierten Zellen weist die Kopplungseffizienz jeweils sehr homogene Werte auf. Dies ist auch anhand der niedrigen Variationskoeffizienten von 3,32% bzw. 1,25% zu sehen. Durch die Schwankungen der Werte der Reserveatmungskapazität (vgl. *Tabelle 8* und *Abbildung 14*) ergeben sich höhere Standardabweichungen und somit auch höhere Variationskoeffizienten.

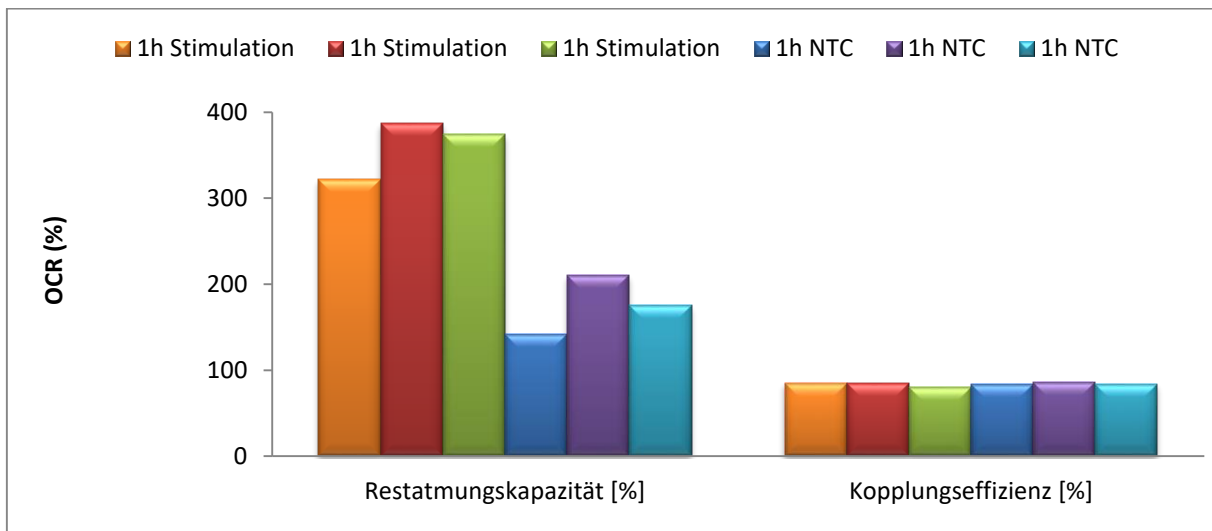


Abbildung 14: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

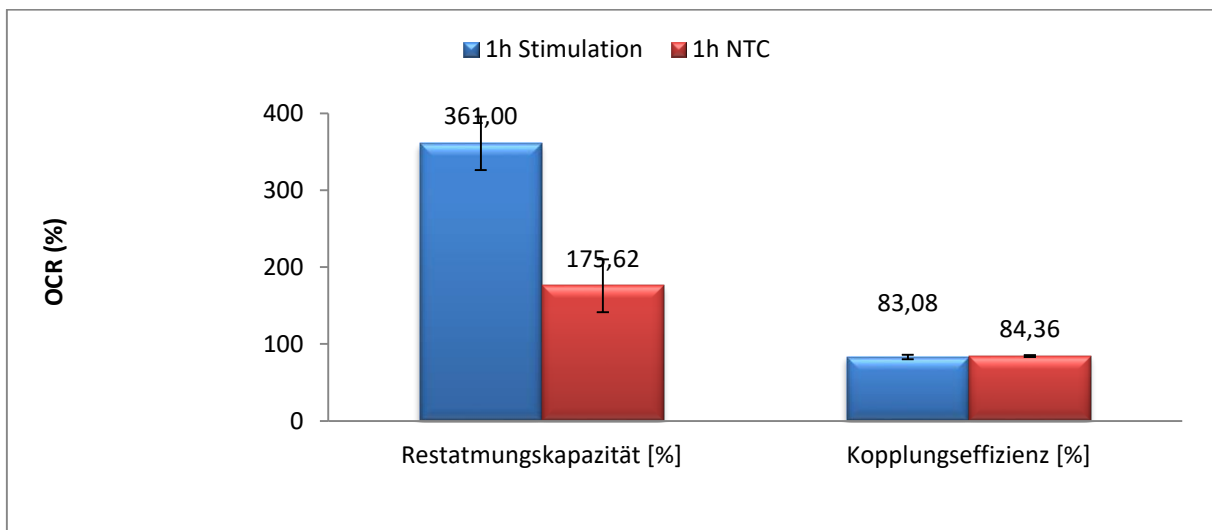


Abbildung 15: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Der Vergleich der Mittelwerte liefert für die stimulierten Zellen eine mehr als doppelt so große Reserveatmungskapazität wie für die Negativkontrolle. Die Kopplungseffizienz ist annähernd gleich.

Der Bioenergetische Gesundheitsindex für die stimulierten und nicht-stimulierten Zellen steht nachfolgend in *Tabelle 9*.

*Tabelle 9: 1h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)*

		BHI
	1h Stimulation	1,58
	1h Stimulation	1,61
	1h Stimulation	1,55
	1h NTC	0,85
	1h NTC	1,34
	1h NTC	1,14
<hr/>		
Mittelwert	1h Stimulation	1,58
Standardabweichung		0,03
Variationskoeffizient		1,88%
<hr/>		
Mittelwert	1h NTC	1,11
Standardabweichung		0,25
Variationskoeffizient		22,24%

Die stimulierten Zellen besitzen mit 1,58 einen höheren BHI als die unstimulierten Zellen (1,11). Der niedrig ausfallende Wert des Wells E bewirkt zusammen mit der verhältnismäßig großen Streuung des BHI bei der Negativkontrolle einen hohen Variationskoeffizienten von 22,24%.

### 3.1.3. 4h Stimulation

Für die THP-1-Zellen, die vier Stunden lang dem Magnetstreifen ausgesetzt waren, ergab sich folgender Verlauf der Mitochondrialen Atmung:

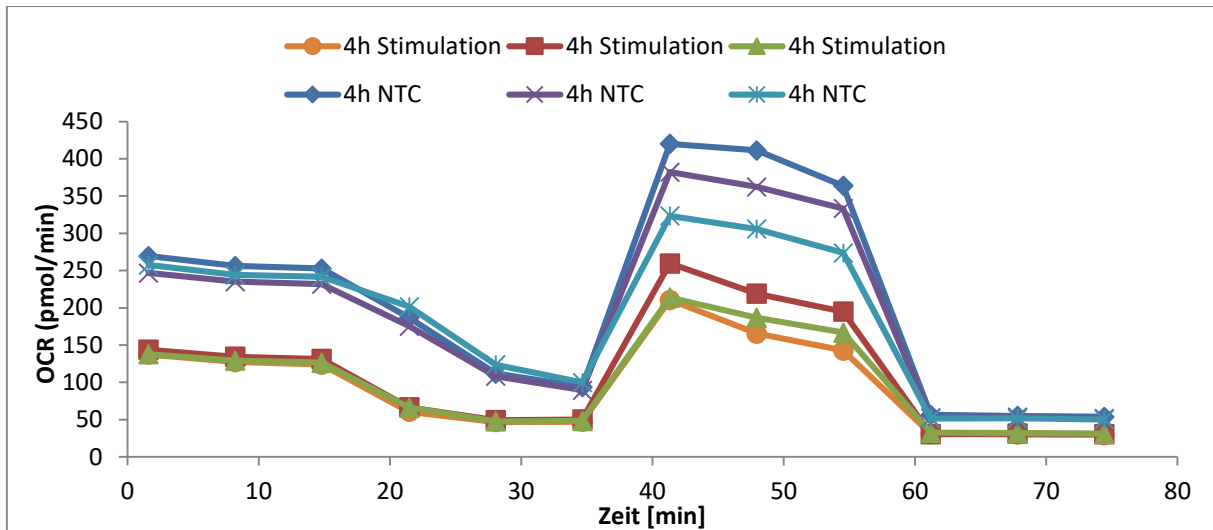


Abbildung 16: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min

Die Werte des OCR der stimulierten Zellen sind durchgehend geringer als die vergleichbaren Werte der Negativkontrolle. Auffällig sind die Schwankungen bei der Maximalatmung, die bei den unstimulierten Zellen ungefähr doppelt so hoch ausfallen wie bei den stimulierten Zellen.

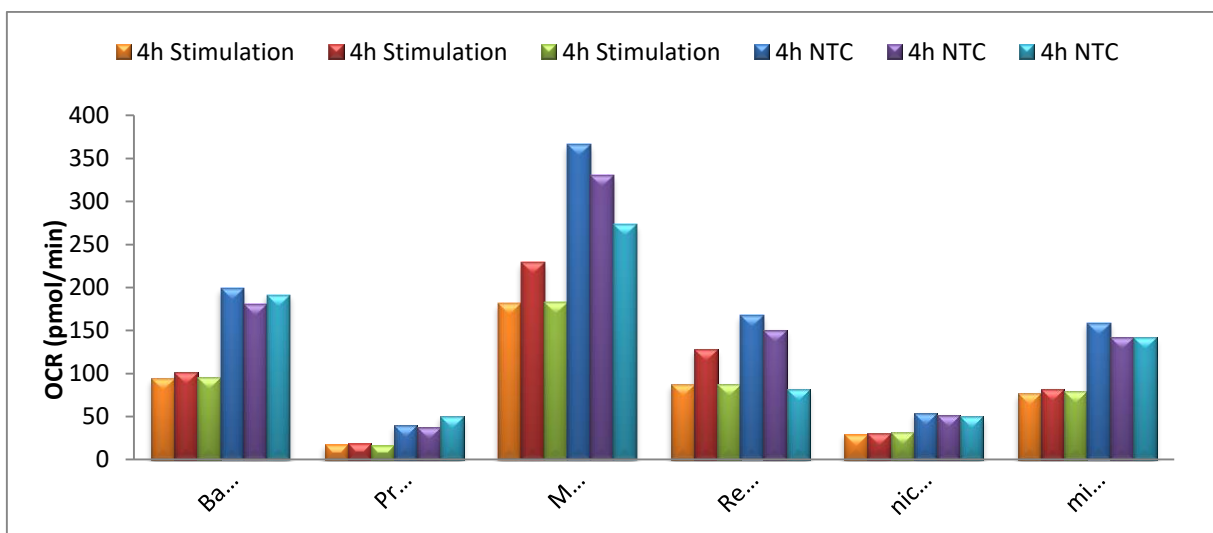
Entsprechend ergeben sich für die Größen der mitochondrialen Atmung die Werte in *Tabelle 10*. Graphisch dargestellt sind diese in den *Abbildungen 17* und *18*.

**Tabelle 10: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min**

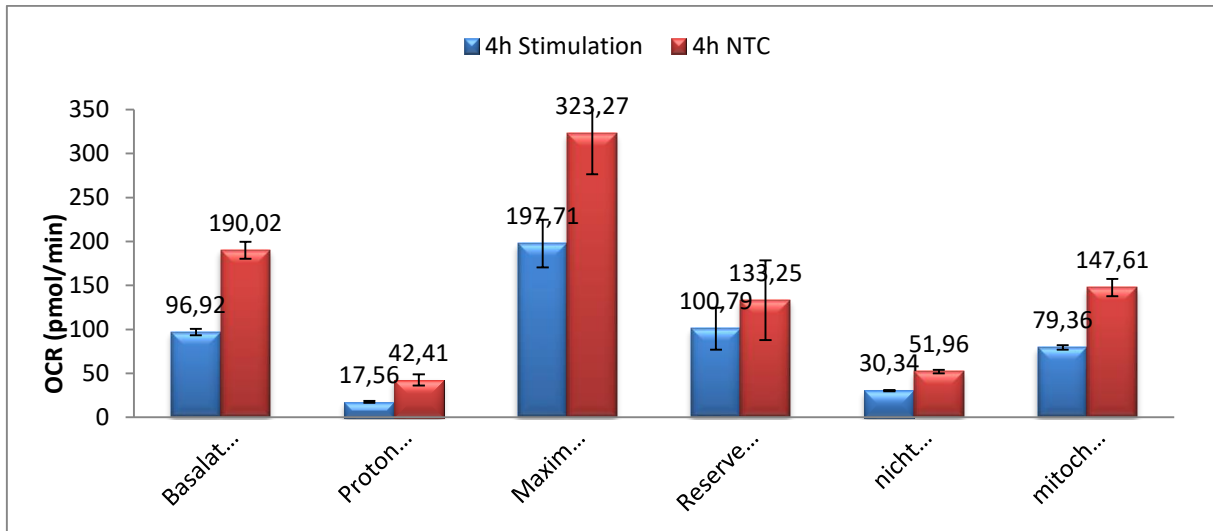
		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	4h Stimulation	94,38	17,27	181,22	86,84	29,39	77,12
	4h Stimulation	100,94	18,84	229,11	128,17	30,51	82,10
	4h Stimulation	95,44	16,57	182,80	87,36	31,10	78,87
	4h NTC	198,78	39,89	366,17	167,39	53,94	158,89
	4h NTC	179,94	37,75	330,41	150,47	51,78	142,19
	4h NTC	191,35	49,59	273,24	81,89	50,16	141,76
<hr/>							
Mittelwert	4h Stimulation	96,92	17,56	197,71	100,79	30,34	79,36
Standard- abweichung		3,52	1,16	27,21	23,72	0,87	2,53
Variationsko- effizient		3,63%	6,60%	13,76%	23,53%	2,86%	3,19%
<hr/>							
Mittelwert	4h NTC	190,02	42,41	323,27	133,25	51,96	147,61
Standard- abweichung		9,49	6,31	46,87	45,28	1,89	9,77
Variationsko- effizient		4,99%	14,88%	14,50%	33,98%	3,65%	6,62%

Die stimulierten Zellen weisen bei der Maximalatmung und der Reserveatmungskapazität die höchsten Standardabweichungen (27,21 bzw. 23,72) und die höchsten Variationskoeffizienten (13,76% bzw. 23,53%) auf. Auffällig ist hier Well C, dessen Werte für die beiden Größen stark nach oben abweichen und für die anderen Größen teils auch über denen der anderen Wells liegen (vgl. *Tabelle 10* und *Abbildung 17*, rote Säule). Die Standardabweichungen der übrigen Größen befinden sich in einem niedrigen Bereich zwischen 0,87 (nicht-mitochondriale Atmung) und

3,52 (Basalatmung). Bis auf die 6,60% des Protonenlecks liegen die Variationskoeffizienten dicht eng beieinander; 2,86% bei der nicht-mitochondrialen Atmung bis hin zu 3,63% bei der Basalatmung. Die Negativkontrolle verzeichnet im Vergleich zu den stimulierten Zellen bei allen Größen jeweils höhere Standardabweichungen, was sich auch in allen Variationskoeffizienten widerspiegelt. Mit 33,98% liegt hier der Wert der Reserveatmungskapazität am höchsten. Protonenleck und Maximalatmung weisen sehr ähnliche Werte auf (14,88% bzw. 14,50%), während die Variationskoeffizienten der übrigen Größen auf unterschiedlichen Niveaus liegen. Die Werte von Well G für das Protonenleck, die Maximalatmung und die Reserveatmungskapazität weichen von den Werten der Wells E und F nach oben bzw. nach unten deutlich ab, was auch in der *Abbildung 17* zu sehen ist.



**Abbildung 17: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min**



**Abbildung 18: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion**

Wie in *Abbildung 17* ist auch in *Abbildung 18* zu sehen, dass die Negativkontrolle höhere Werte für die Größen der mitochondrialen Atmung aufweist als die stimulierten Zellen.

Die prozentuale Reserveatmungskapazität und die Kopplungseffizienz sind in *Tabelle 11* und den *Abbildungen 19* und *20* zu sehen.

**Tabelle 11: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	4h Stimulation	192,00	81,71
	4h Stimulation	226,98	81,34
	4h Stimulation	191,54	82,63
	4h NTC	184,21	79,93
	4h NTC	183,62	79,02
	4h NTC	142,79	74,08
<hr/>			
Mittelwert		203,51	81,89
Standardabweichung	4h Stimulation	20,33	0,67
Variationskoeffizient		9,99%	0,81%
<hr/>			
Mittelwert		170,21	77,68
Standardabweichung	4h NTC	23,74	3,15
Variationskoeffizient		13,95%	4,05%

Die Reserveatmungskapazität beider untersuchten Zellen besitzt höhere Standardabweichungen und Variationskoeffizienten als die Kopplungseffizienz. Wie bei den vorangegangenen Versuchen sind die Werte der Kopplungseffizienz relativ homogen verteilt (s. *Abbildung 19*). Bei beiden Größen ist zu beobachten, dass Well G geringere Werte aufweist als Well E und F.

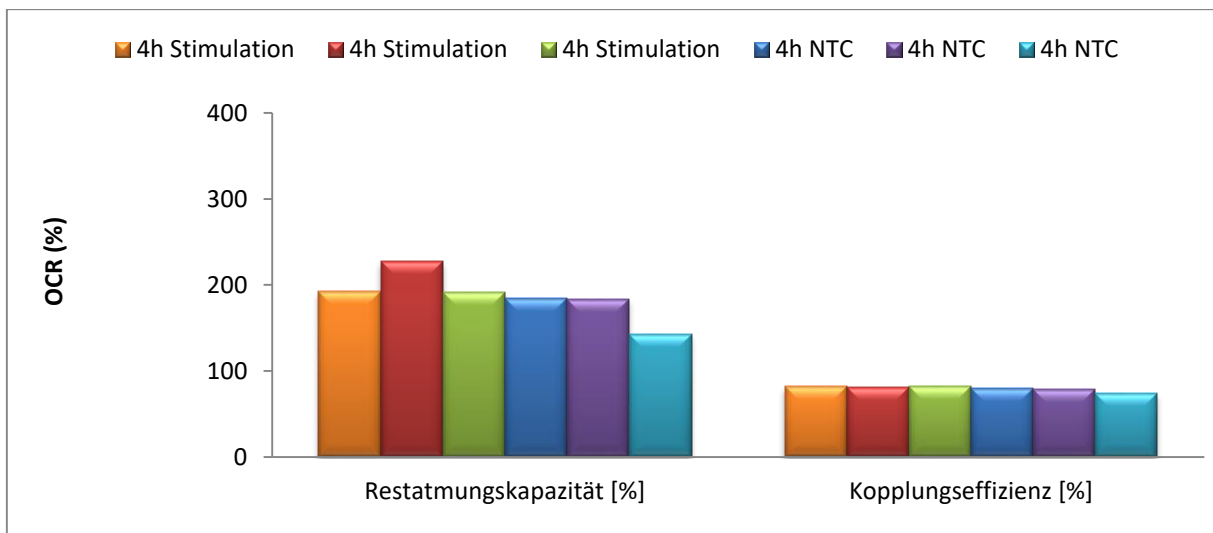


Abbildung 19: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

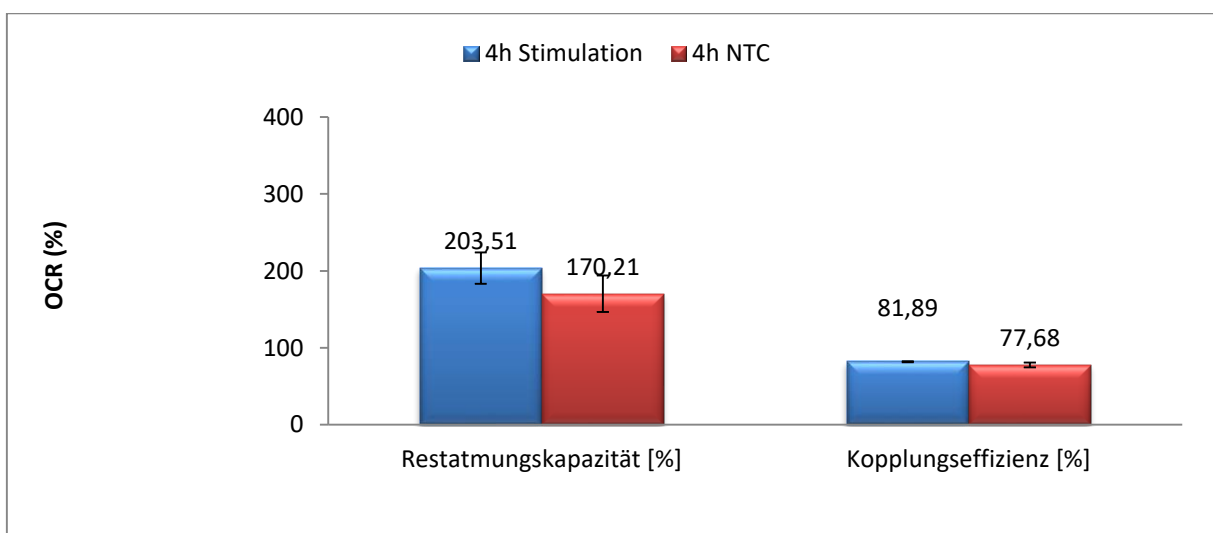


Abbildung 20: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Im Gegensatz zu den Größen der mitochondrialen Atmung besitzen die stimulierten Zellen eine höhere prozentuale Reserveatmungskapazität als die nicht-stimulierten Zellen. Auch die Kopplungseffizienz ist zugunsten der stimulierten Zellen erhöht, liegt aber auf einem ähnlichen Niveau wie das der Negativkontrolle.

In *Tabelle 12* sind die Werte des Bioenergetischen Gesundheitsindex zu finden.

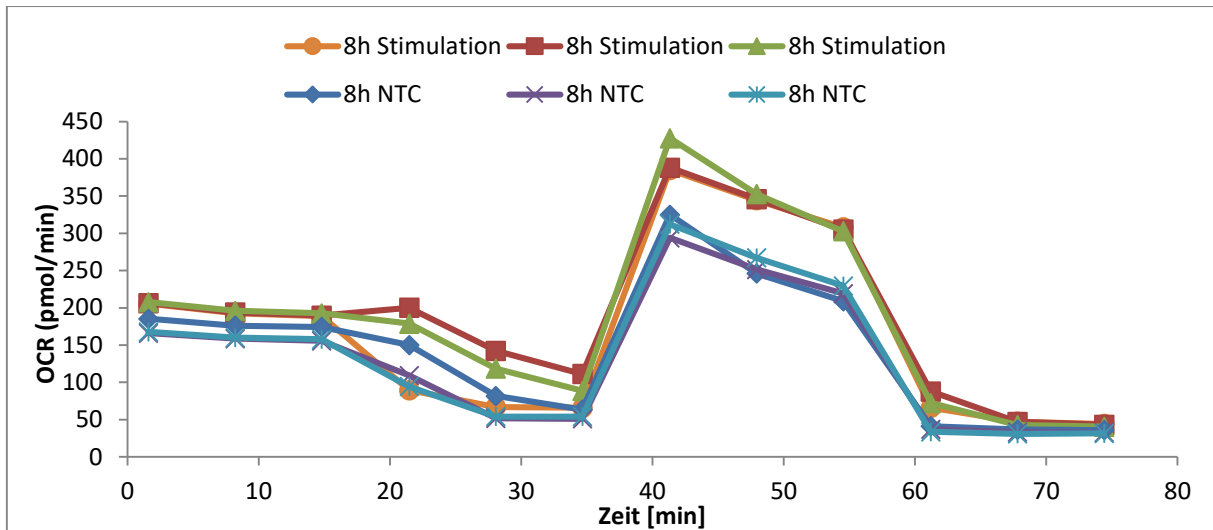
*Tabelle 12: 4h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)*

		BHI
	4h Stimulation	1,12
	4h Stimulation	1,26
	4h Stimulation	1,13
	4h NTC	1,09
	4h NTC	1,04
	4h NTC	0,67
<hr/>		
Mittelwert	4h Stimulation	1,17
Standardabweichung		0,08
Variationskoeffizient		6,89%
<hr/>		
Mittelwert	4h NTC	0,93
Standardabweichung		0,23
Variationskoeffizient		24,70%

Der BHI der stimulierten Zellen ist bis auf den leicht erhöhten Wert des Wells C sehr ähnlich. Bei der Negativkontrolle liegt der BHI von Well G deutlich unter dem der anderen Wells, was zu dem hohen Variationskoeffizienten von 24,70% führt.

### 3.1.4. 8h Stimulation

Die mitochondriale Atmung der acht Stunden lang stimulierten Zellen und der unstimulierten Kontrolle ist nachfolgend in *Abbildung 21* zu sehen.



*Abbildung 21: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min*

Der OCR der Negativkontrolle weist nur geringfügig niedrigere Werte auf als die stimulierten Zellen. Im Zeitraum zwischen 20 und 35 Minuten (nach Zugabe von Oligomycin) sind innerhalb der stimulierten und der nicht-stimulierten Zellen Differenzen zwischen den Wells zu erkennen, wobei Well B im Vergleich zu Well C und D stark abfällt und auf einem Niveau mit der Negativkontrolle liegt.

Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion ergeben sich zu den in *Tabelle 13* aufgeführten Werten. In den *Abbildungen 22* und *23* sind die Werte graphisch dargestellt.

**Tabelle 13: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min**

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	8h Stimulation	144,82	21,63	341,01	196,20	44,16	123,19
	8h Stimulation	146,61	68,23	345,08	198,46	43,05	78,38
	8h Stimulation	152,22	48,24	387,21	234,99	40,49	103,99
	8h NTC	138,37	27,43	288,86	150,49	36,08	110,94
	8h NTC	122,97	18,54	261,44	138,47	32,62	104,43
	8h NTC	127,01	23,21	281,43	154,42	30,79	103,80
<hr/>							
Mittelwert	8h Stimulation	147,88	46,03	357,77	209,89	42,56	101,85
Standard- abweichung		3,86	23,38	25,58	21,77	1,88	22,48
Variationsko- effizient		2,61%	50,79%	7,15%	10,37%	4,43%	22,07%
<hr/>							
Mittelwert	8h NTC	129,45	23,06	277,24	147,79	33,16	106,39
Standard- abweichung		7,98	4,45	14,18	8,31	2,69	3,95
Variationsko- effizient		6,17%	19,29%	5,11%	5,62%	8,11%	3,71%

Die Standardabweichungen der stimulierten Zellen für das Protonenleck, die Maximalatmung, die Reserveatmungskapazität und die mitochondriale ATP-Produktion liegen alle über 20. Durch den geringen Mittelwert des Protonenlecks weist dieses mit 50,79% einen sehr hohen Variationskoeffizienten auf. Bedingt wird dies durch die Wells C und D, deren Werte ungefähr dreimal bzw. zweimal so hoch ausfallen wie der Wert des Wells B. Die mitochondriale ATP-Produktion besitzt mit 22,07% den zweithöchsten Variationskoeffizienten. Trotz der höchsten

Standardabweichung (25,58) liegt der Variationskoeffizient der Maximalatmung der allgemein hohen Werte relativ niedrig (7,15%). Bei den unstimulierten Zellen verzeichnet das Protonenleck mit 19,29% den höchsten Variationskoeffizienten, während die Werte der übrigen Größen zwischen 3,71% (mitochondriale ATP-Produktion) und 8,11% (nicht-mitochondriale Atmung) liegen.

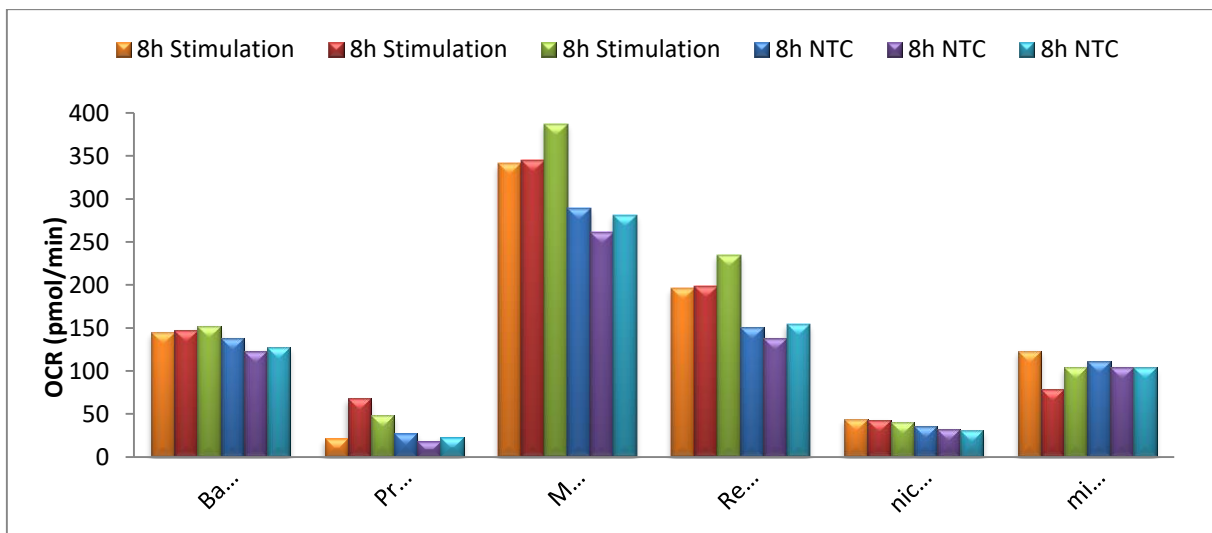


Abbildung 22: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min

In *Abbildung 22* ist der Anstieg des OCR von Well C im Messpunkt 4 (s.o.) als rote Säule beim Protonenleck deutlich zu erkennen. Durch das relativ hohe Protonenleck folgt für Well C eine niedrigere mitochondriale ATP-Produktion als bei den Wells B und D; sichtbar an der roten Säule in *Abbildung 22*.

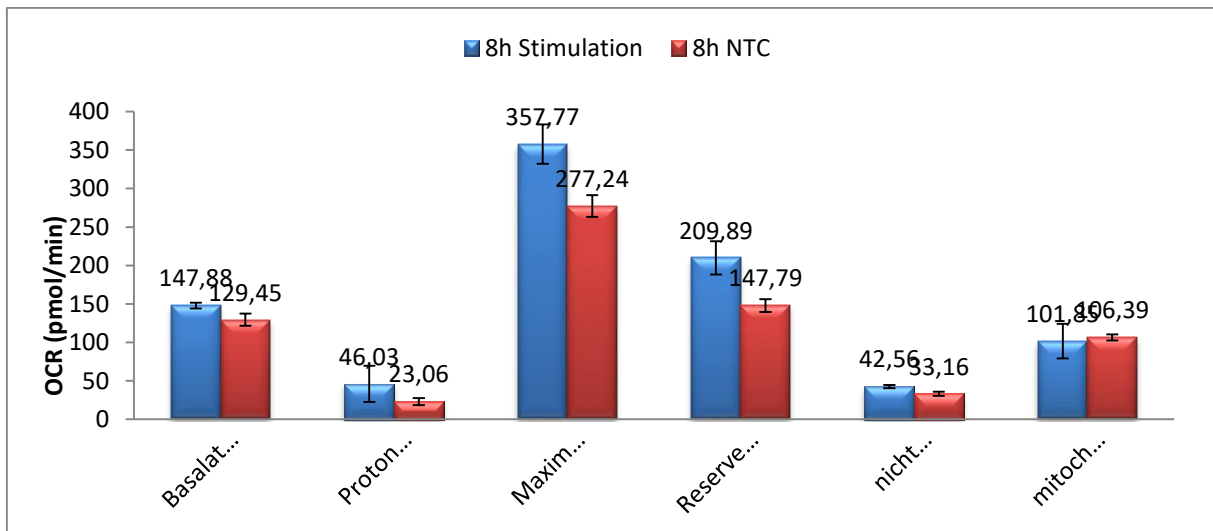


Abbildung 23: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion

Passend zur mitochondrialen Atmung zeigen die Mittelwerte für den OCR höhere Werte bei den stimulierten als bei den nicht-stimulierten Zellen. Einzig die mitochondriale ATP-Produktion weist ein umgekehrtes Ergebnis auf.

Die Tabelle 14 zeigt die Reserveatmungskapazität und die Kopplungseffizienz, die in den Abbildungen 24 und 25 visualisiert sind.

Tabelle 14: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	8h Stimulation	235,48	85,07
	8h Stimulation	235,37	53,46
	8h Stimulation	254,37	68,31
	8h NTC	208,76	80,17
	8h NTC	212,60	84,92
	8h NTC	221,58	81,72
<hr/>			
Mittelwert		241,74	68,95
Standardabweichung	8h Stimulation	10,94	15,81
Variationskoeffizient		4,53%	22,93%
<hr/>			
Mittelwert		214,31	82,27
Standardabweichung	8h NTC	6,58	2,42
Variationskoeffizient		3,07%	2,94%

Die stimulierten Zellen weisen im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen höhere Standardabweichungen auf. Mit Werten von 4,53% und 3,07% befindet sich die Reserveatmungskapazität beider Zellen auf einem niedrigen Niveau. Für die Kopplungseffizienz schwanken die Werte der Wells B bis D etwas, was sich in der Standardabweichung und dem hohen Variationskoeffizienten von 22,93% niederschlägt. Mit 2,42 bzw. 2,94% fallen die Standardabweichung und der Variationskoeffizient der Kopplungseffizienz der Negativkontrolle am geringsten aus.

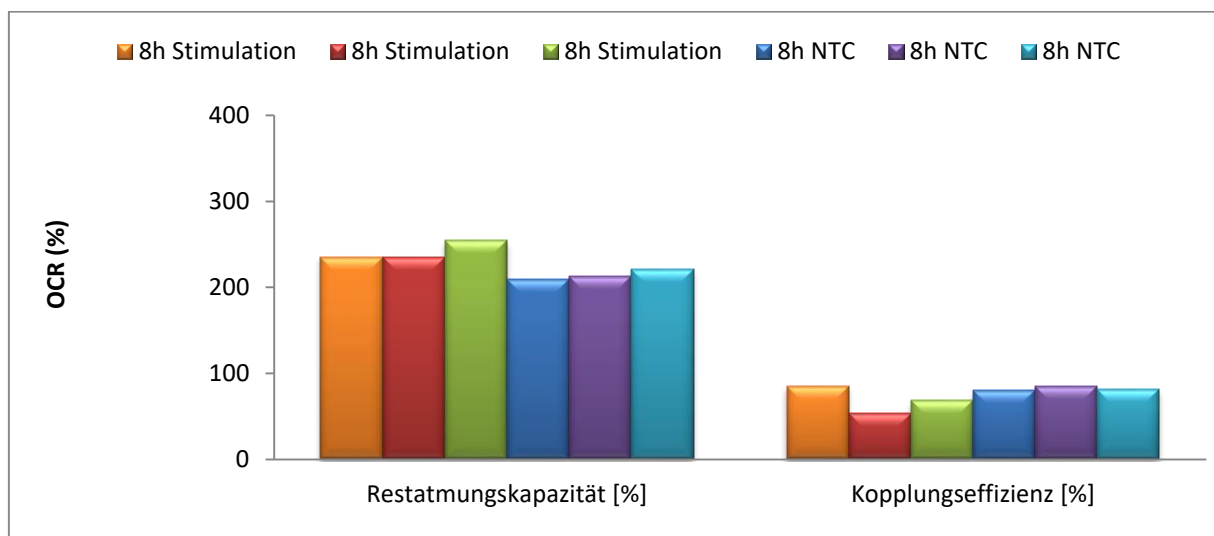


Abbildung 24: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

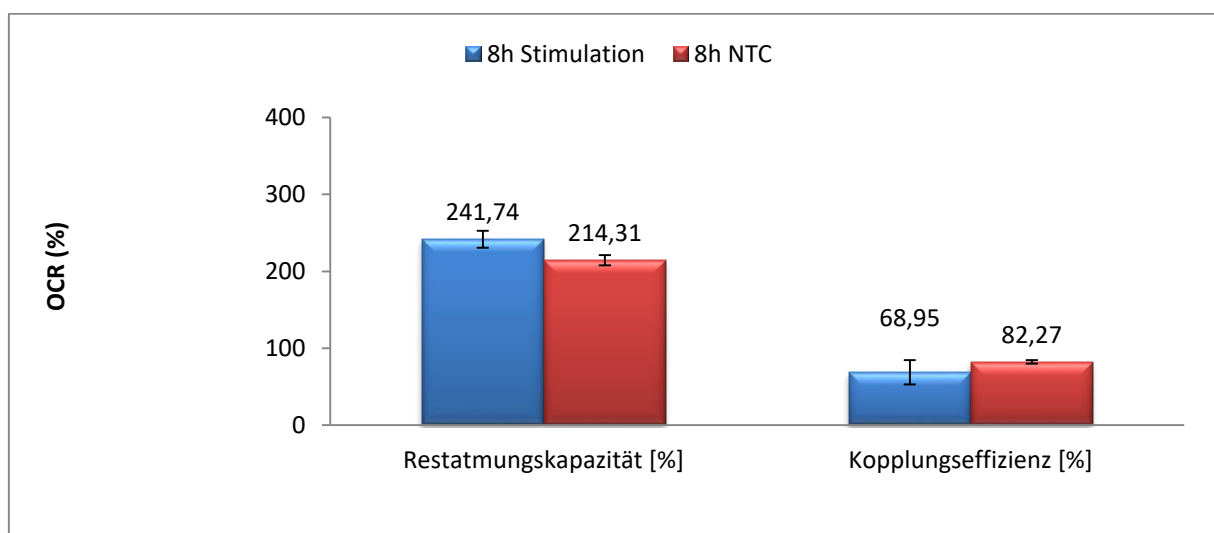


Abbildung 25: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Die Reserveatmungskapazität der stimulierten Zellen liegt geringfügig höher als die der Negativkontrolle. Bei der Kopplungseffizienz fällt auf, dass die unstimulierten Zellen höhere Werte aufweisen als die stimulierten Zellen.

Die Werte des Bioenergetischen Gesundheitsindex sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

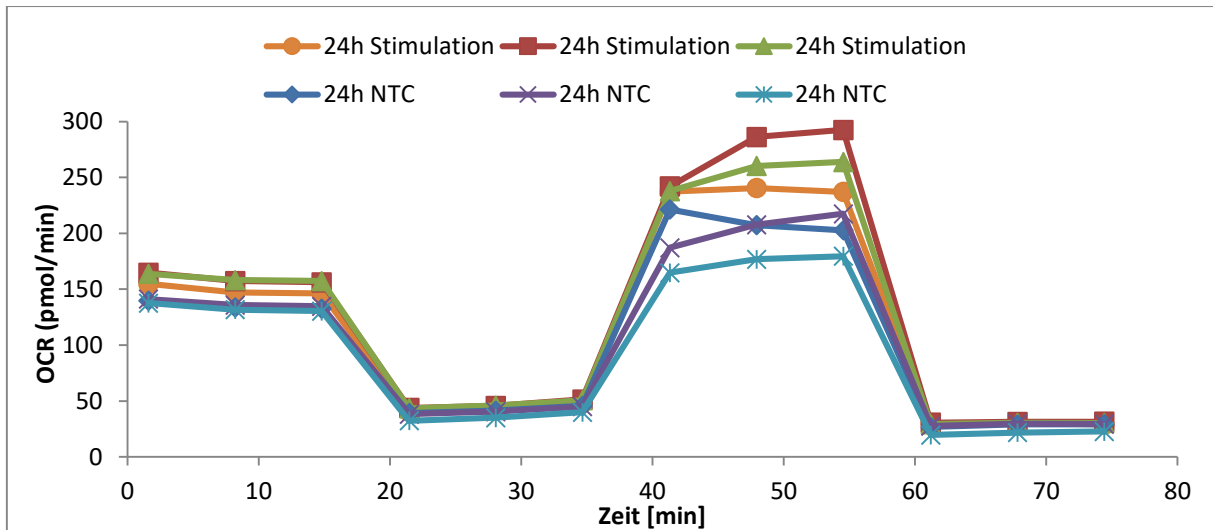
*Tabelle 15: 8h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)*

		BHI
	8h Stimulation	1,40
	8h Stimulation	0,72
	8h Stimulation	1,10
	8h NTC	1,23
	8h NTC	1,38
	8h NTC	1,35
<hr/>		
Mittelwert	8h Stimulation	1,07
Standardabweichung		0,34
Variationskoeffizient		31,65%
<hr/>		
Mittelwert	8h NTC	1,32
Standardabweichung		0,08
Variationskoeffizient		6,12%

Der BHI der nicht-stimulierten Zellen ist mit 1,32 höher als jener der stimulierten Zellen. Der Grund für den auffallend hohen Variationskoeffizienten der stimulierten Zellen von 31,65% liegt in dem geringen Wert des Wells C, der halb so groß ist wie der BHI des Wells B.

### 3.1.5. 24h Stimulation

Die 24 Stunden lange Stimulation der THP-1-Zellen ergab für die mitochondriale Atmung einen Verlauf, der in *Abbildung 26* zu sehen ist.



*Abbildung 26: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min*

Im Bereich der Maximalatmung lassen sich Unterschiede zwischen den stimulierten und den nicht-stimulierten Zellen erkennen. Diese Differenzen fallen zum Teil jedoch eher gering aus (vgl. Well B und Well E). Auch innerhalb der beiden Gruppen variieren die Werte. Außerdem lässt sich beobachten, dass nach der Zugabe von FCCP der OCR fast aller Wells im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen ansteigt.

Die aus der mitochondrialen Atmung resultierenden Größen stehen in der *Tabelle 16* und sind in den *Abbildungen 27* und *28* graphisch aufgetragen.

**Tabelle 16: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min**

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	24h Stimulation	117,20	11,39	211,56	94,36	28,97	105,81
	24h Stimulation	125,59	13,19	261,98	136,39	30,59	112,40
	24h Stimulation	128,06	14,20	234,62	106,57	29,25	113,86
	24h NTC	105,94	12,38	194,64	88,70	26,75	93,55
	24h NTC	107,05	10,60	189,77	82,72	27,65	96,45
	24h NTC	110,93	12,74	160,01	49,08	19,54	98,19
<hr/>							
Mittelwert	24h Stimulation	123,62	12,93	236,06	112,44	29,61	110,69
Standard- abweichung		5,69	1,42	25,24	21,62	0,87	4,29
Variationsko- effizient		4,60%	11,00%	10,69%	19,23%	2,93%	3,87%
<hr/>							
Mittelwert	24h NTC	107,97	11,91	181,48	73,50	24,65	96,06
Standard- abweichung		2,62	1,15	18,75	21,36	4,44	2,34
Variationsko- effizient		2,43%	9,62%	10,33%	29,06%	18,02%	2,44%

Die stimulierten Zellen weisen mit 2,93% bei der nicht-mitochondrialen Atmung den geringsten Variationskoeffizienten auf, der zusammen mit der mitochondrialen ATP-Produktion (3,87%) und der Basalatmung (4,60%) sehr niedrige Werte liefert. Die Standardabweichung der Reserveatmungskapazität von 21,62 führt zum höchsten Variationskoeffizienten mit 19,23%. Der Grund hierfür findet sich in der Streuung der Werte der drei Wells. Trotz des großen Unterschiedes bei den Standardabweichungen (1,42 bzw. 25,24) liegen die Variationskoeffizienten von

Protonenleck und Maximalatmung mit 11,00% bzw. 10.69% dicht beieinander, was durch die generell geringeren Werte des Protonenlecks und die höheren Werte der Maximalatmung bedingt ist. Die unstimulierten Zellen besitzen bei der Reserveatmungskapazität die höchste Standardabweichung (21,36), die mit dem höchsten Variationskoeffizienten (29,06%) einhergeht. Basalatmung und mitochondriale ATP-Produktion liegen hier mit 2,43% und 2,44% auf einem sehr niedrigen Niveau.

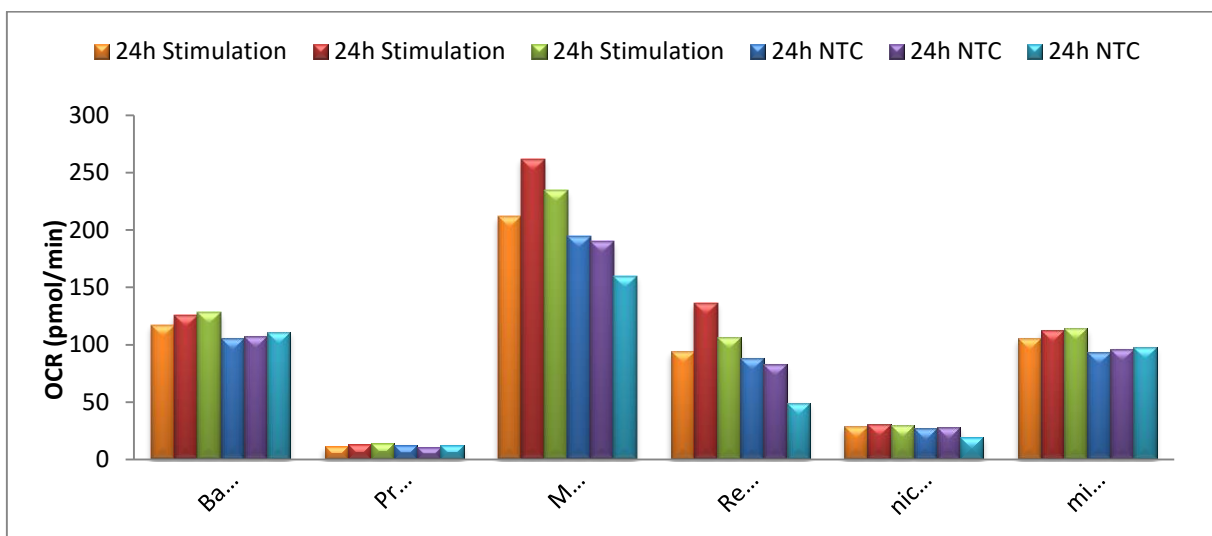
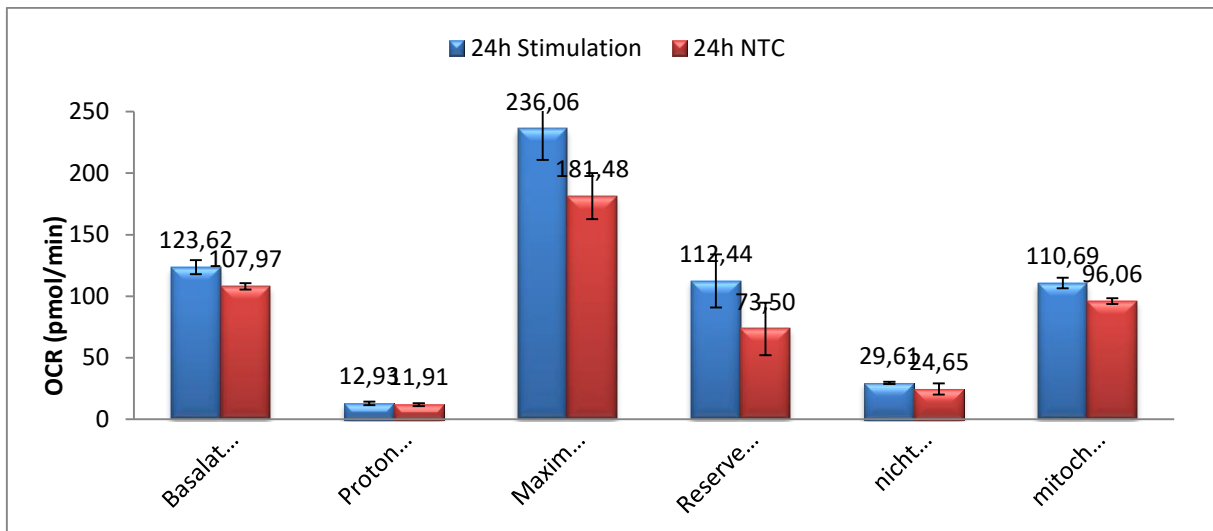


Abbildung 27: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min

Bei Betrachtung der *Abbildung 27* fällt auf, dass Well C (rote Säule) mit Ausnahme des Protonenlecks stets höhere Werte liefert als die Wells B und D. Well G (türkise Säule) liegt bei der Maximalatmung, der Reserveatmungskapazität und der nicht-mitochondrialen Atmung sichtbar unter den Wells E und F, die auch bei den übrigen Größen sehr ähnliche Werte aufweisen.



**Abbildung 28: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion**

Die stimulierten Zellen können in allen Größen der mitochondrialen Atmung höhere Werte als die nicht-stimulierten Zellen verzeichnen. Bis auf das Protonenleck und die nicht-mitochondriale Atmung ist die Differenz deutlich zu erkennen.

Die berechneten Werte der prozentualen Reserveatmungskapazität und der Kopplungseffizienz stehen nachfolgend in *Tabelle 17*. Die *Abbildungen 29* und *30* zeigen die Daten graphisch.

*Tabelle 17: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %*

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	24h Stimulation	180,51	90,28
	24h Stimulation	208,60	89,50
	24h Stimulation	183,22	88,91
	24h NTC	183,73	88,31
	24h NTC	177,28	90,10
	24h NTC	144,25	88,52
<hr/>			
Mittelwert	24h Stimulation	190,77	89,56
Standardabweichung		15,50	0,69
Variationskoeffizient		8,12%	0,77%
<hr/>			
Mittelwert	24h NTC	168,42	88,97
Standardabweichung		21,18	0,98
Variationskoeffizient		12,58%	1,10%

Die Standardabweichungen der Reserveatmungskapazität liegen bei beiden Gruppen im Vergleich zur Kopplungseffizienz höher und führen auch zu den höheren Variationskoeffizienten. Diese sind bei der Kopplungseffizienz mit 0,77% bei den stimulierten und 1,10% bei den nicht-stimulierten Zellen äußerst gering, da auch die Standardabweichungen sehr niedrige Werte besitzen (0,69 bzw. 0,98).

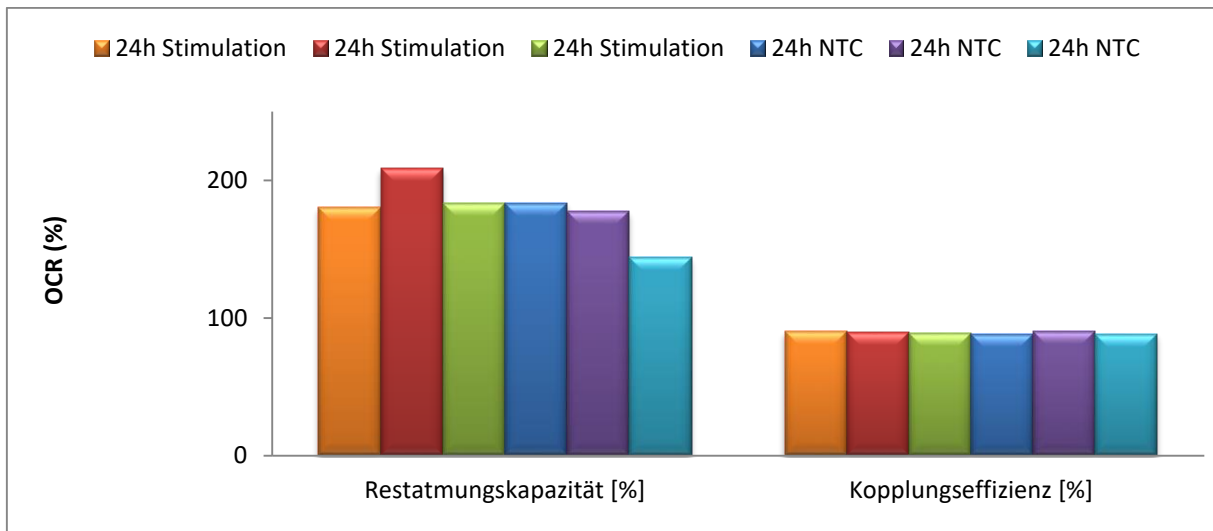


Abbildung 29: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Die Kopplungseffizienz ist über alle sechs Wells sehr homogen verteilt. Bei der Reserveatmungskapazität weisen Well C (rote Säule) und Well G (türkise Säule) eine Abweichung von den anderen Wells nach oben bzw. nach unten auf.

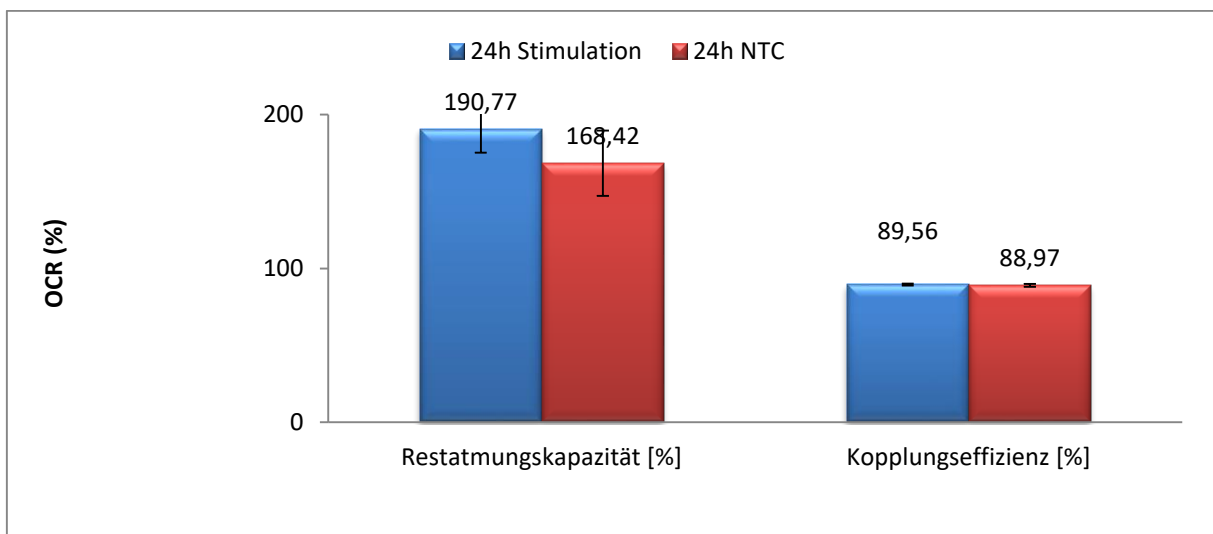


Abbildung 30: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Die Reserveatmungskapazität der stimulierten Zellen nimmt höhere Werte an als die Negativkontrolle. Das gleiche gilt auch für die Kopplungseffizienz, wobei der Unterschied äußerst gering ist.

In *Tabelle 18* finden sich die Werte des Bioenergetischen Gesundheitsindex'.

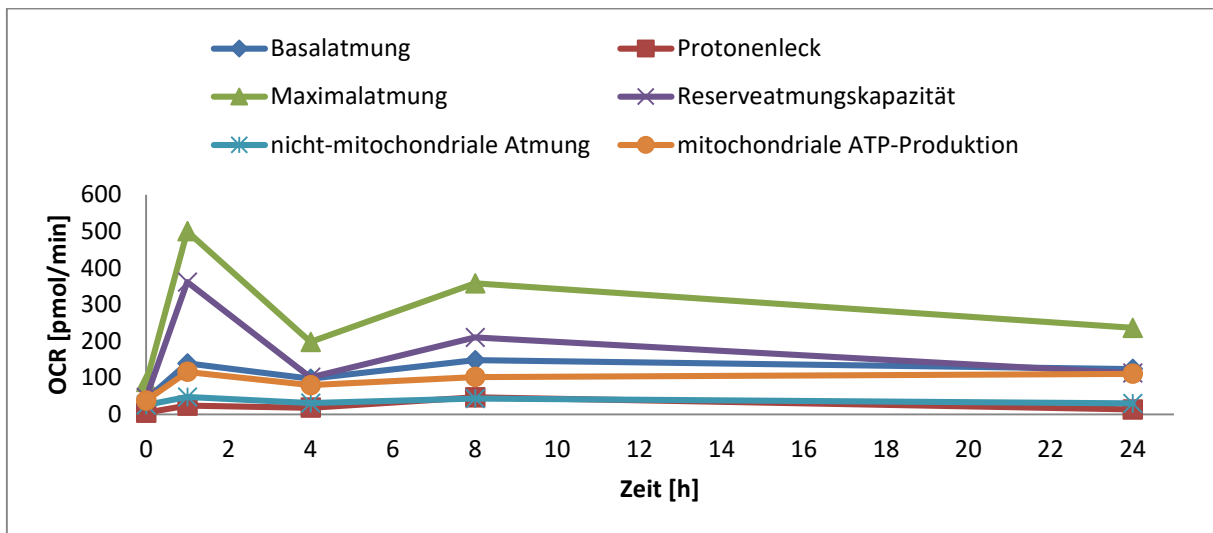
**Tabelle 18: 24h Stimulation der THP-1-Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)**

		BHI
	24h Stimulation	1,48
	24h Stimulation	1,58
	24h Stimulation	1,47
	24h NTC	1,40
	24h NTC	1,43
	24h NTC	1,29
<hr/>		
Mittelwert	24h Stimulation	1,51
Standardabweichung		0,06
Variationskoeffizient		4,10%
<hr/>		
Mittelwert	24h NTC	1,37
Standardabweichung		0,08
Variationskoeffizient		5,62%

Der BHI der stimulierten Zellen liegt mit 1,51 höher als jener der nicht-stimulierten Zellen (1,37). Große Schwankungen der Werte der einzelnen Wells sind bei beiden Gruppen nicht zu erkennen, was auch die niedrige Standardabweichungen von 0,06 bzw. 0,08 widerspiegelt. Die Variationskoeffizienten befinden sich mit 4,10% und 5,62% auf einem eher geringen Niveau.

### 3.1.6. Kinetik der mitochondrialen Atmung

In der *Abbildung 31* ist die Kinetik der mitochondrialen Atmung der stimulierten THP-1-Zellen zu sehen. Aufgetragen ist der OCR in  $\text{pmol O}_2/\text{min}$  gegen die Zeit in Stunden.



*Abbildung 31: Entwicklung der mitochondrialen Atmung der stimulierten THP-1-Zellen in  $\text{pmol O}_2/\text{min}$*

Für alle Parameter ist nach einer Stunde Stimulation im Vergleich zum Vorversuch (0h) ein Anstieg des OCR zu erkennen. Dieser fällt nach vier Stunden wieder ab und steigt nach acht Stunden wieder etwas an. Basalatmung und Protonenleck besitzen im Gegensatz zu den anderen Größen nach acht Stunden höhere Werte als nach vier Stunden Stimulation. Nach 24 Stunden sinkt der OCR durchgehend wieder; nur die mitochondriale ATP-Produktion steigt etwas an. Die größten Schwankungen treten bei der Maximalatmung und der Reserveatmungskapazität auf.

Die Entwicklung für die mitochondriale Atmung der nicht-stimulierten THP-1-Zellen ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

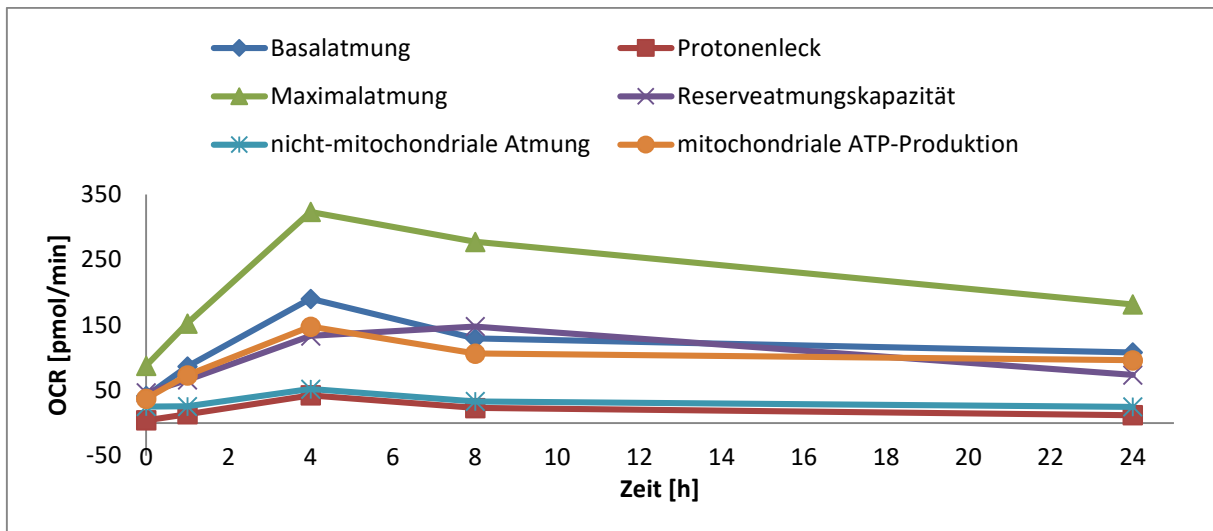


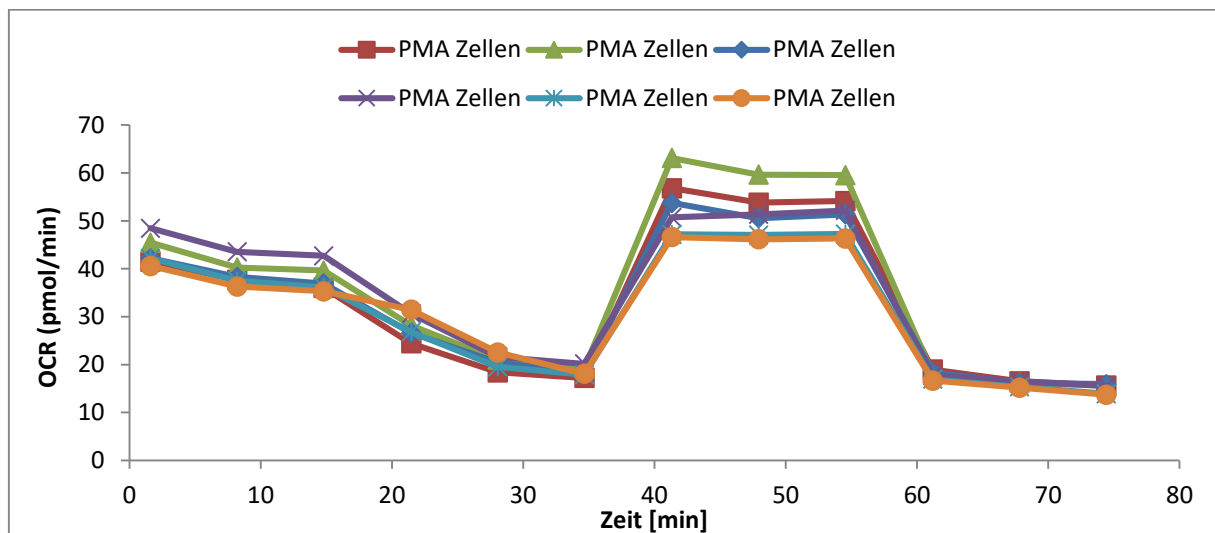
Abbildung 32: Entwicklung der mitochondrialen Atmung der nicht-stimulierten THP-1-Zellen in pmol O<sub>2</sub>/min

Alle Größen der mitochondrialen Atmung steigen im Laufe der Zeit bis vier Stunden an und fallen bis auf die Reserveatmungskapazität danach wieder ab.

## 3.2. PMA-differenzierte Zellen

### 3.2.1. Vorversuch

Als Vorbetrachtung für nachfolgende Versuche wurden THP-1-Zellen der Passage 19 genutzt, bei denen mittels PMA eine Ausdifferenzierung zu Makrophagen vorgenommen wurde. Durch den Test im *Seahorse* wurde ein Bild des Ist-Zustandes der Zellen aufgenommen. Die mitochondriale Atmung der PMA-differenzierten Zellen ist in der folgenden *Abbildung 33* zu sehen.



*Abbildung 33: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min*

Für die Sechsfachbestimmung ergeben sich ähnliche Verläufe, die nach FCCP-Zugabe die größten Inhomogenitäten aufweisen. Für die Basalatmung, das Protonenleck, die Maximalatmung, die Reserveatmungskapazität, die nicht-mitochondriale Atmung und die mitochondriale ATP-Produktion stehen die berechneten Werte in *Tabelle 19* und sind mit den Mittelwerten und Standardabweichungen in den *Abbildungen 34* und *35* abgebildet.

**Tabelle 19: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min**

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	Well B	20,39	1,56	41,18	20,79	15,65	18,83
	Well C	24,02	3,52	47,50	23,47	15,62	20,50
	Well D	21,03	-0,32	37,83	16,80	15,91	18,63
	Well E	27,18	-2,40	36,61	9,43	15,54	22,56
	Well F	22,23	3,98	33,37	11,14	13,90	18,25
	Well G	21,60	4,39	32,92	11,32	13,70	17,21
<hr/>							
Mittelwert		22,74	1,79	38,23	15,49	15,05	19,33
Standard- abweichung		2,50	2,71	5,46	5,77	0,98	1,91
Variationsko- effizient		11,01%	151,21%	14,29%	37,25%	6,52%	9,88%

Die Standardabweichungen aller Größen bewegen sich in einem Bereich zwischen 0,98 (nicht-mitochondriale Atmung) und 5,77 (Reserveatmungskapazität). Hingegen variieren die Variationskoeffizienten stark. Mit 151,21% liefert das Protonenleck hier einen Ausreißer, der keinen realen Wert widerspiegelt. Grund sind die negativen Werte der Wells D und E, die trotzdem in die Berechnung mit eingeflossen sind. Den geringsten Variationskoeffizienten besitzt die nicht-mitochondriale Atmung (6,52%). Mitochondriale ATP-Produktion, Basalatmung und Maximalatmung liegen auf einem ähnlichen Niveau. Die Reserveatmungskapazität hat abgesehen vom Protonenleck mit 37,25% den höchsten Variationskoeffizienten, was an der Streuung der Werte liegt.

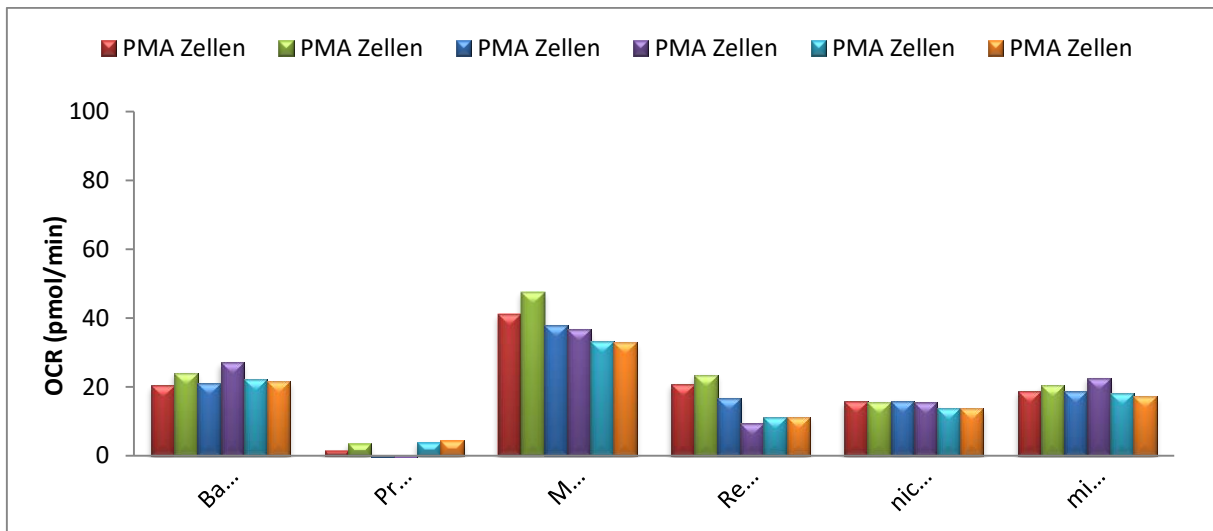


Abbildung 34: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatemungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min

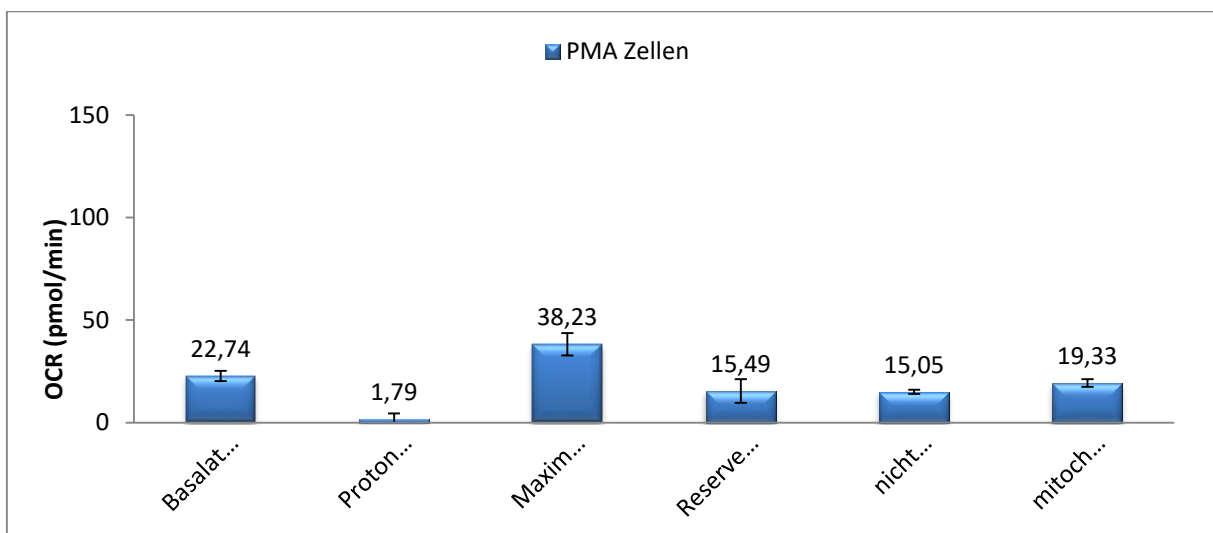


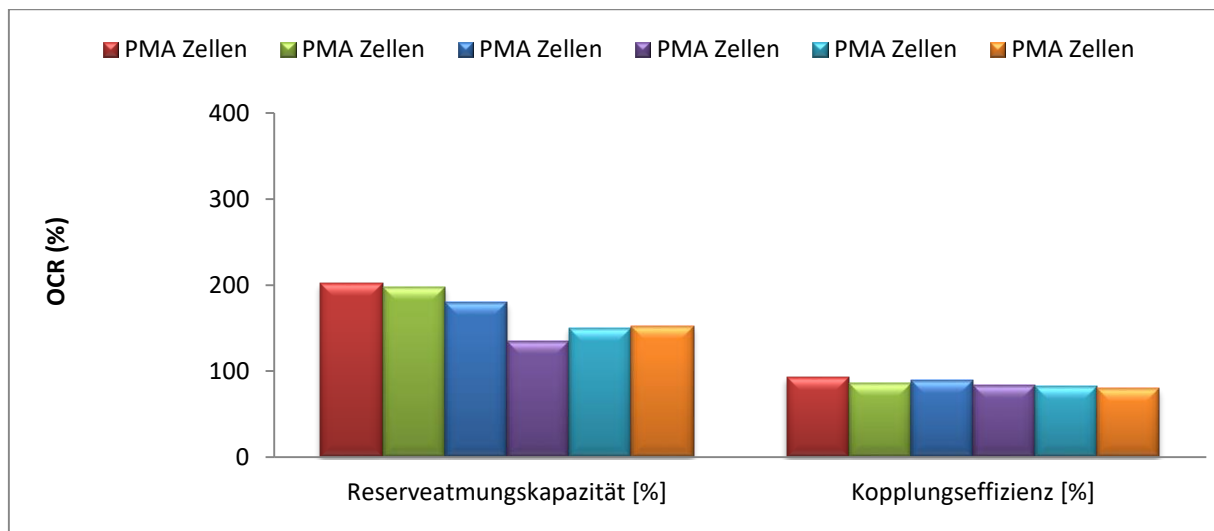
Abbildung 35: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatemungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion

Rechnerisch ergeben sich die prozentuale Reserveatemungskapazität und die Kopplungseffizienz zu den in *Tabelle 20* und den in *Abbildung 36* und *37* dargestellten Werten.

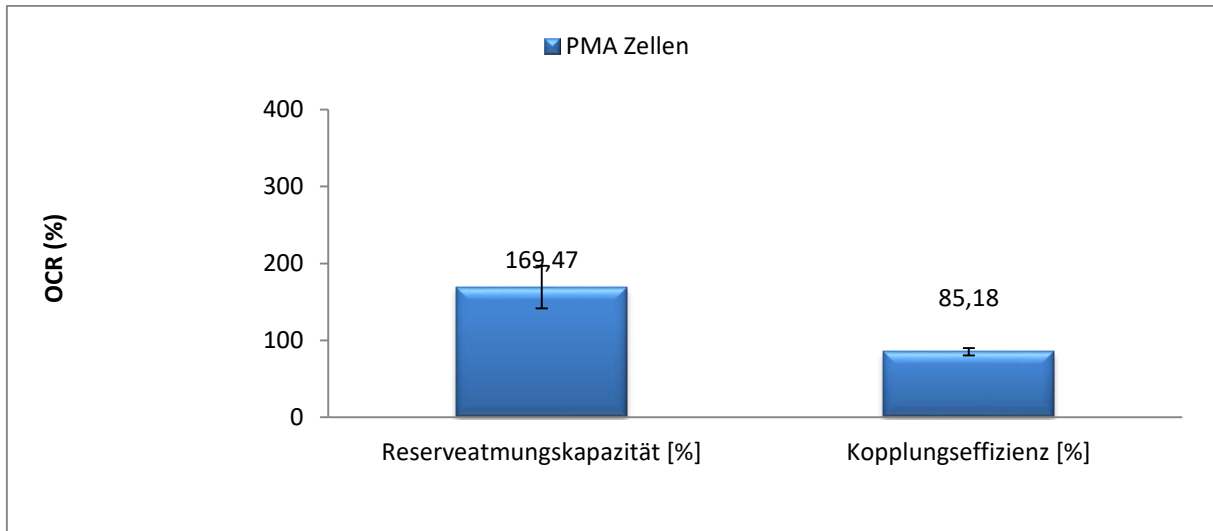
**Tabelle 20: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	Well B	201,95	92,35
	Well C	197,71	85,34
	Well D	179,92	88,60
	Well E	134,71	83,01
	Well F	150,11	82,12
	Well G	152,41	79,65
<hr/>			
Mittelwert		169,47	85,18
Standardabweichung		27,70	4,64
Variationskoeffizient		16,34%	5,45%

Bei der Reserveatmungskapazität variieren die Werte im Bereich zwischen 134,71 (Well E) und 201,95 (Well B), was zu einer Standardabweichung von 27,70 und einem Variationskoeffizienten von 16,34% führt, die beide höher liegen als die der Kopplungseffizienz.



**Abbildung 36: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**



**Abbildung 37: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

Der Bioenergetische Gesundheitsindex der PMA-differenzierten Zellen ist nachfolgend in *Tabelle 21* zu finden.

**Tabelle 21: Vorversuch mit PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)**

	BHI
Well B	1,21
Well C	0,94
Well D	1,29
Well E	1,14
Well F	0,57
Well G	0,51
Mittelwert	0,94
Standardabweichung	0,33
Variationskoeffizient	35,49%

Die einzelnen BHI der Wells unterscheiden sich zum Teil deutlich, was dazu führt, dass der Variationskoeffizient mit 35,49% hoch ausfällt.

### 3.2.2. 1h Stimulation

Für die eine Stunde mit dem Magnetstreifen bzw. dem Mock-Magnetstreifen stimulierten PMA-differenzierten Zellen ergab sich nach der Untersuchung im Seahorse der folgende Verlauf der mitochondrialen Atmung:

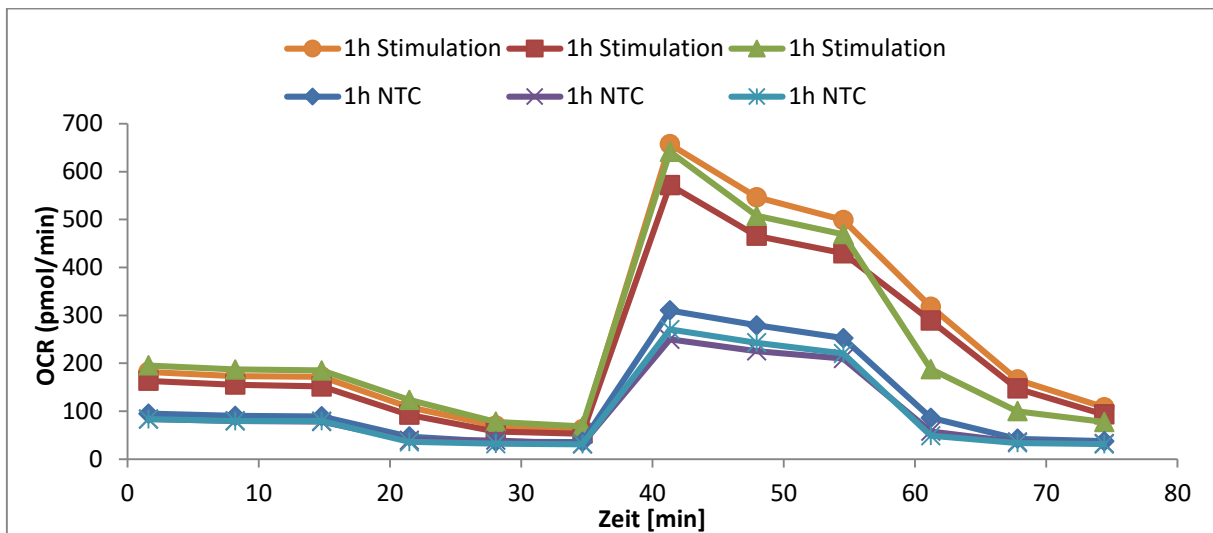


Abbildung 38: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min

Die mitgeführte Negativkontrolle weist in der Dreifachbestimmung sehr homogene Verläufe auf, während bei den stimulierten Zellen einige Abweichungen untereinander zu erkennen sind. Nach der Zugabe von Rotenone/Antimycin A fällt bei diesen der OCR langsam und kontinuierlich. Deutlich sichtbar sind die höheren Werte des OCR bei den stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

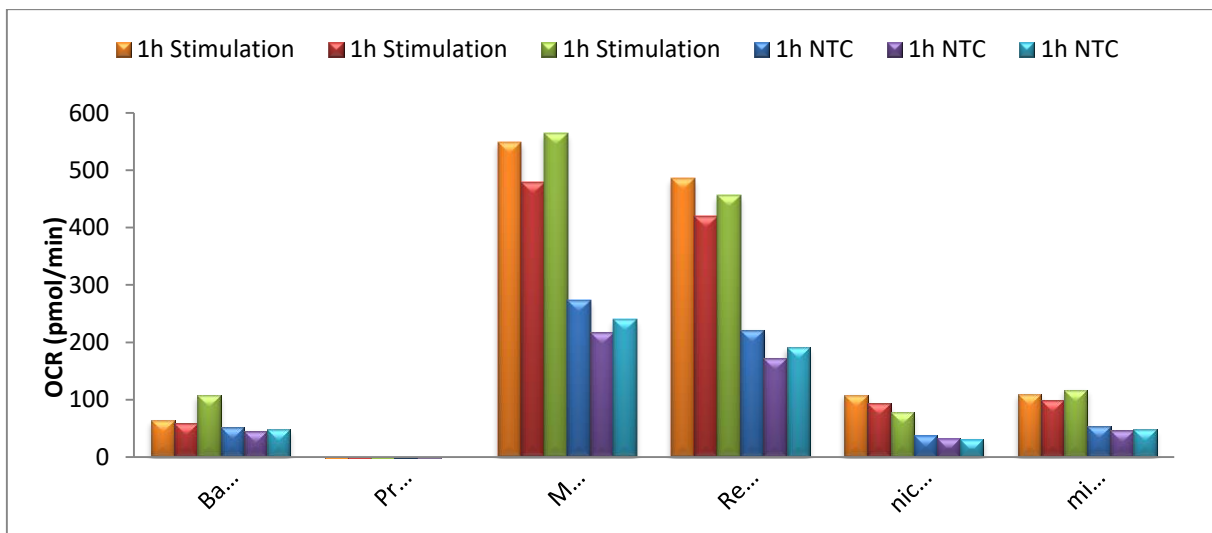
Die sich aus der mitochondrialen Atmung ergebenden weiteren Größen sind mit den Mittelwerten und den Standardabweichungen der zusammengefassten stimulierten und unstimulierten Zellen in der *Tabelle 22* und den *Abbildungen 39* und *40* zu sehen.

**Tabelle 22: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min**

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	1h Stimulation	64,05	-45,60	549,16	485,11	108,07	109,65
	1h Stimulation	58,54	-39,84	478,82	420,28	92,99	98,38
	1h Stimulation	107,55	-9,14	563,95	456,40	77,35	116,69
	1h NTC	51,60	-1,69	273,11	221,51	37,36	53,29
	1h NTC	45,42	-0,82	217,42	172,00	32,55	46,24
	1h NTC	48,16	-0,05	239,54	191,38	31,15	48,21
<hr/>							
Mittelwert		76,71	-31,53	530,64	453,93	92,80	108,24
Standard- abweichung	1h Stimulation	26,85	19,60	45,49	32,48	15,36	9,24
Variationsko- effizient		35,00%	-62,17%	8,57%	7,16%	16,55%	8,53%
<hr/>							
Mittelwert		48,39	-0,85	243,36	194,96	33,69	49,25
Standard- abweichung	1h NTC	3,10	0,82	28,04	24,95	3,26	3,64
Variationsko- effizient		6,40%	-96,00%	11,52%	12,80%	9,67%	7,39%

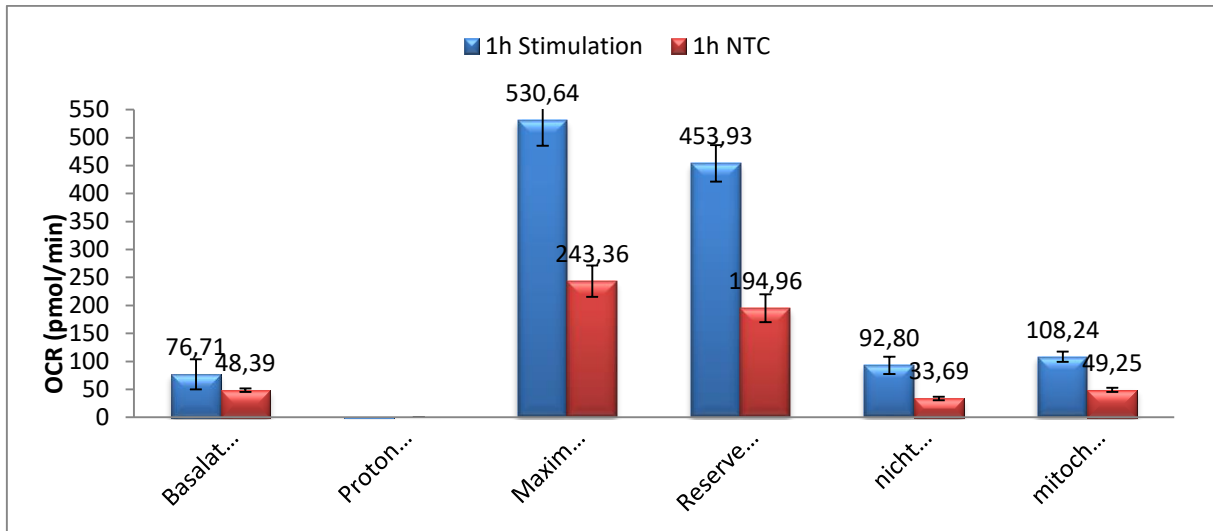
Bei der Betrachtung der Tabelle fällt als erstes auf, dass alle Wells beim Protonenleck negative Werte besitzen. Dementsprechend sind die rechnerischen Mittelwerte und Variationskoeffizienten auch negativ. Reale Zustände werden somit nicht widerspiegelt. Die Standardabweichungen der stimulierten Zellen liegen bis auf eine Ausnahme alle über 15, was in der Streuung der Werte aller Wells begründet liegt. Die Variationskoeffizienten der Reserveatmungskapazität, der mitochondrialen ATP-Produktion und der Maximalatmung nehmen Werte unter 10%

an, während die Basalatmung mit 35,00% den höchsten Wert besitzt. Die nicht-stimulierten Zellen weisen für jede Größe geringe Standardabweichungen auf. Alle Variationskoeffizienten, außer der des Protonenlecks, liegen nicht sehr weit auseinander und bewegen sich zwischen 6,40% (Basalatmung) und 12,80% (Reserveatmungskapazität).



*Abbildung 39: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min*

In *Abbildung 39* ist zu sehen, dass bei der Basalatmung Well D (grüne Säule) deutlich von den anderen Wells abweicht. Bei der Maximalatmung und der Reserveatmungskapazität ist der Unterschied zwischen den Wells innerhalb einer Gruppe gut sichtbar. Die Werte der Negativkontrolle bei der Basalatmung, der nicht-mitochondrialen Atmung und der mitochondrialen ATP-Produktion weichen nur geringfügig voneinander ab.



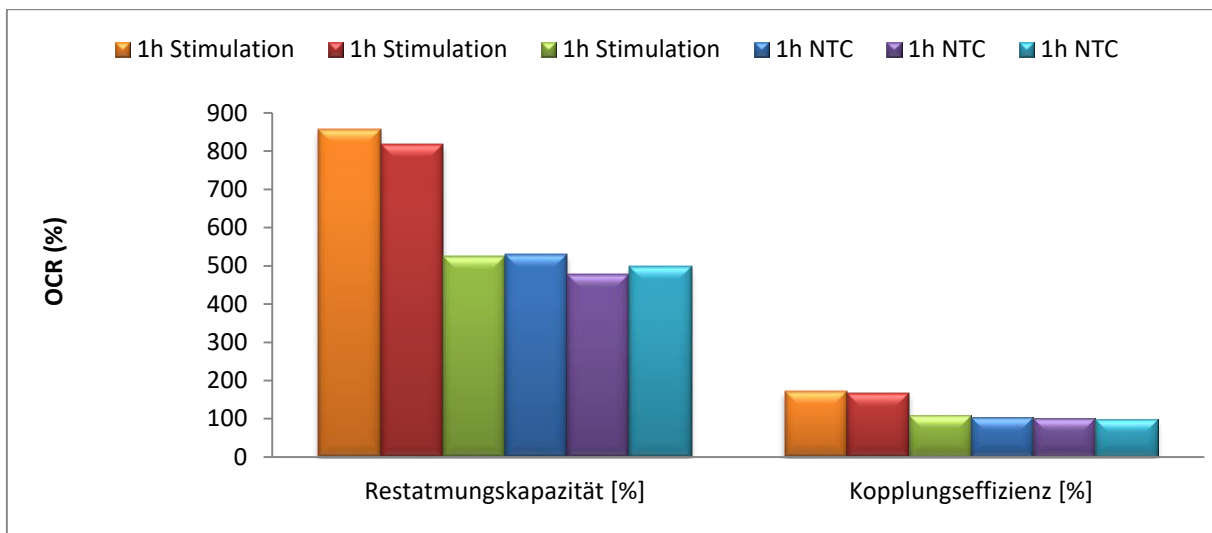
**Abbildung 40:** 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion

Die stimulierten Zellen weisen durchgehend höhere Werte aller Größen als die unstimulierten Zellen auf. Außer bei der Basalatmung sind diese Werte teils mehr als doppelt so hoch. Die Reserveatmungskapazität und die Kopplungseffizienz in Prozent sind tabellarisch und graphisch im Folgenden aufgetragen:

**Tabelle 23:** 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	1h Stimulation	857,38	171,20
	1h Stimulation	817,96	168,06
	1h Stimulation	524,36	108,50
	1h NTC	529,24	103,27
	1h NTC	478,69	101,81
	1h NTC	497,41	100,10
<b>Mittelwert</b>			
Mittelwert	1h Stimulation	733,23	149,25
Standardabweichung	1h Stimulation	181,96	35,33
Variationskoeffizient	1h Stimulation	24,82%	23,67%
<b>Mittelwert</b>			
Mittelwert	1h NTC	501,78	101,73
Standardabweichung	1h NTC	25,56	1,58
Variationskoeffizient	1h NTC	5,09%	1,56%

Die Standardabweichungen der stimulierten Zellen sind größer als die der Negativkontrolle, ebenso die Variationskoeffizienten. Diese liegen mit 24,82% und 23,67% bei den stimulierten Zellen dicht beieinander. Die Variationskoeffizienten der unstimulierten Zellen sind deutlich niedriger und zeigen eine eher geringe Schwankung der Werte.



**Abbildung 41: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

Auffällig bei der Betrachtung der *Abbildung 41* sind die vergleichsweise hohen Werte der Reserveatmungskapazität und der Kopplungseffizienz der Wells B und C (orange und rote Säule). Well D liegt bei beiden Größen auf einem Niveau mit den Wells E bis G.

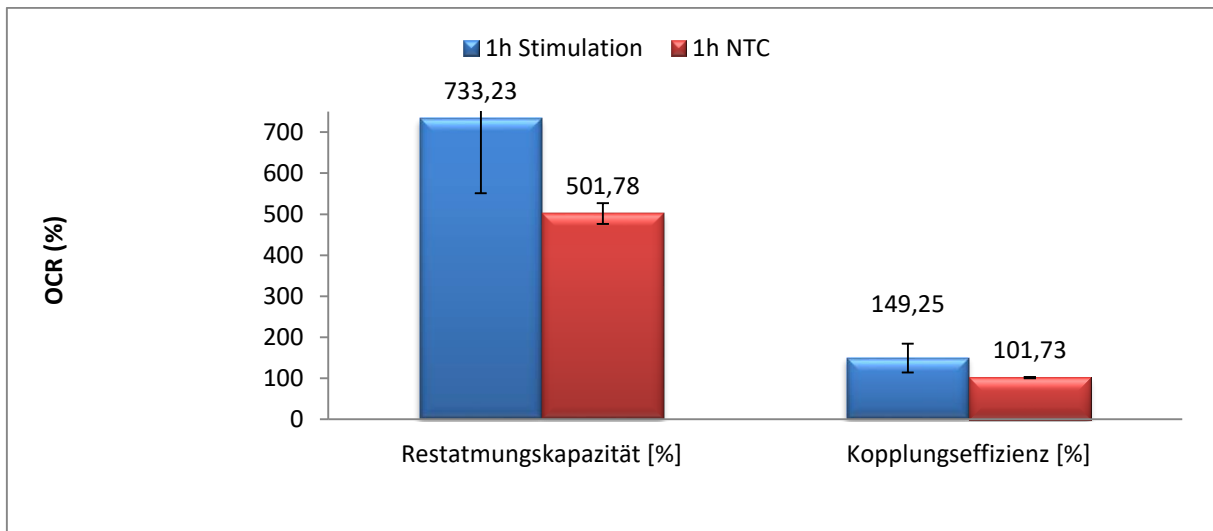


Abbildung 42: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Sowohl Reserveatmungskapazität als auch Kopplungseffizienz liefern für die stimulierten Zellen höherer Werte als die Negativkontrolle.

In der *Tabelle 24* steht der Bioenergetische Gesundheitsindex der stimulierten und unstimulierten PMA-differenzierten Zellen.

Tabelle 24: 1h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)

		BHI
	1h Stimulation	2,69
	1h Stimulation	2,65
	1h Stimulation	2,84
	1h NTC	2,50
	1h NTC	2,39
	1h NTC	2,47
<b>Mittelwert</b>		
Mittelwert	1h Stimulation	2,73
Standardabweichung	1h Stimulation	0,10
Variationskoeffizient	1h Stimulation	3,65%
<b>Mittelwert</b>		
Mittelwert	1h NTC	2,45
Standardabweichung	1h NTC	0,06
Variationskoeffizient	1h NTC	2,37%

Der BHI der nicht-stimulierten Zellen liegt mit 2,45 etwas unter dem BHI der stimulierten Zellen (2,73). Die relativ ähnlichen Werte innerhalb einer Gruppe führen zu den geringen Standardabweichungen und den niedrigen Varationskoeffizienten.

### 3.2.3. 4h Stimulation

Die PMA-differenzierten Zellen, die dem Magnetstreifen bzw. dem Mock-Magnetstreifen für vier Stunden ausgesetzt waren, wiesen folgenden Verlauf der mitochondrialen Atmung auf:

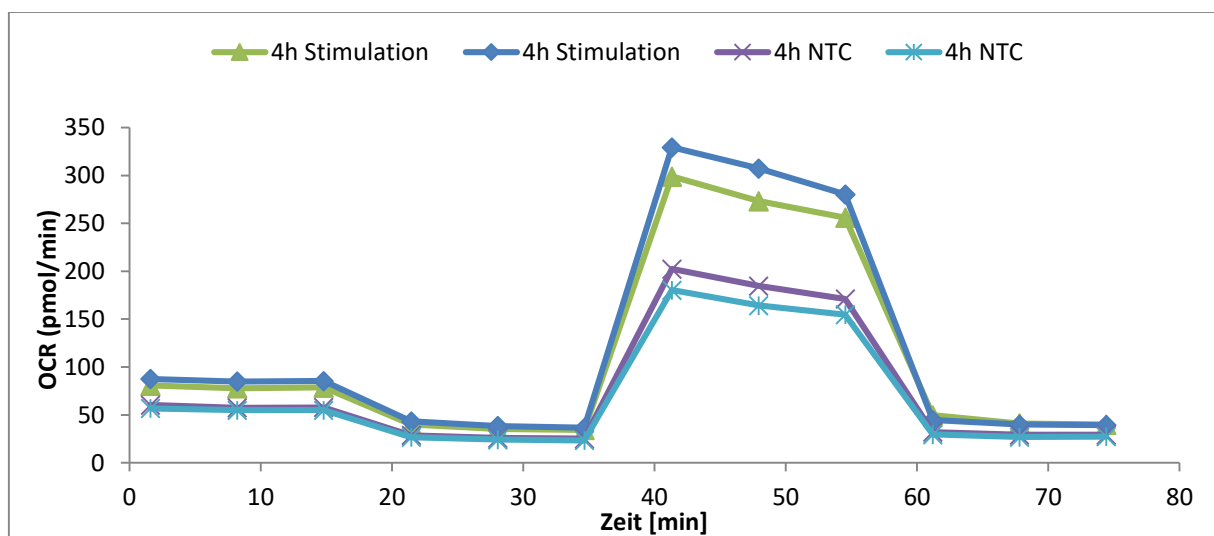


Abbildung 43: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min

Sowohl stimulierte als auch nicht-stimulierte Zellen besitzen untereinander ähnliche Werte, wobei der OCR der stimulierten Zellen nach FCCP-Zugabe um ungefähr 200 pmol/min höher liegt als jener der Negativkontrolle.

In *Tabelle 25* sind die aus der mitochondrialen Atmung resultierenden Größen gesammelt.

**Tabelle 25: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min**

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	4h Stimulation	38,79	-5,57	259,02	220,23	39,97	44,36
	4h Stimulation	45,96	-2,87	289,91	243,95	39,51	48,83
	4h NTC	28,63	-3,87	173,20	144,56	29,19	32,50
	4h NTC	28,07	-3,47	153,38	125,32	26,93	31,53
Mittelwert		42,37	-4,22	274,47	232,09	39,74	46,59
Standard- abweichung	4h Stimulation	5,07	1,91	21,84	16,77	0,33	3,16
Variationsko- effizient		11,97%	-45,27%	7,96%	7,23%	0,83%	6,78%
Mittelwert		28,35	-3,67	163,29	134,94	28,06	32,02
Standard- abweichung	4h NTC	0,40	0,28	14,01	13,61	1,60	0,69
Variationsko- effizient		1,42%	-7,70%	8,58%	10,09%	5,70%	2,14%

Wie zuvor bei der einstündigen Stimulation der PMA-Zellen ist auch hier zu sehen, dass das Protonenleck aller Wells durchgehend negative Werte annimmt. Den geringsten Variationskoeffizienten verzeichnen die stimulierten Zellen bei der nicht-mitochondrialen Atmung (0,83%). Mit 11,97% weist die Basalatmung den höchsten Wert auf. Mitochondriale ATP-Produktion, Reserveatmungskapazität und Maximalatmung bewegen sich im Bereich zwischen 6,78% und 7,96%. Mit Ausnahme der nicht-mitochondrialen Atmung liefern die unstimulierten Zellen niedrigere Werte für die Standardabweichungen. Im Gegensatz zur anderen Gruppe besitzt hier die Basalatmung den geringsten Variationskoeffizient (1,42%). Die Reserveatmungskapazität stellt mit 10,09% den höchsten Wert dar.

Die Abbildungen 44 und 45 stellen die Werte aus Tabelle 25 graphisch dar.

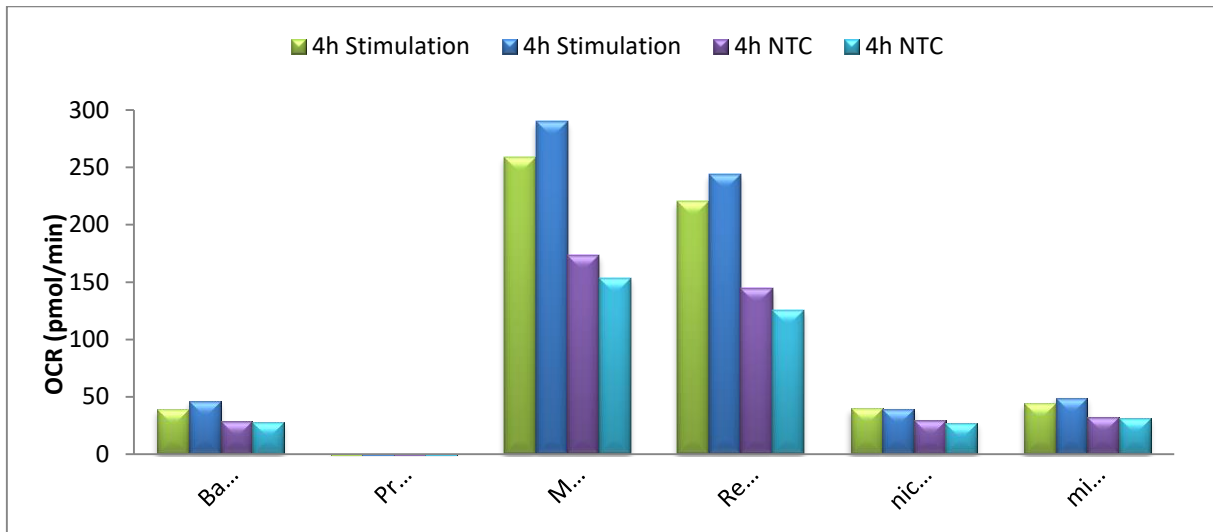


Abbildung 44: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatemungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min

Bis auf die nicht-mitochondriale Atmung besitzt Well C (blaue Säule) höhere Werte als Well B (grüne Säule). Well D und E befinden sich außer bei der Maximalatemung und der Reserveatemungskapazität auf einem sehr ähnlichen Niveau.

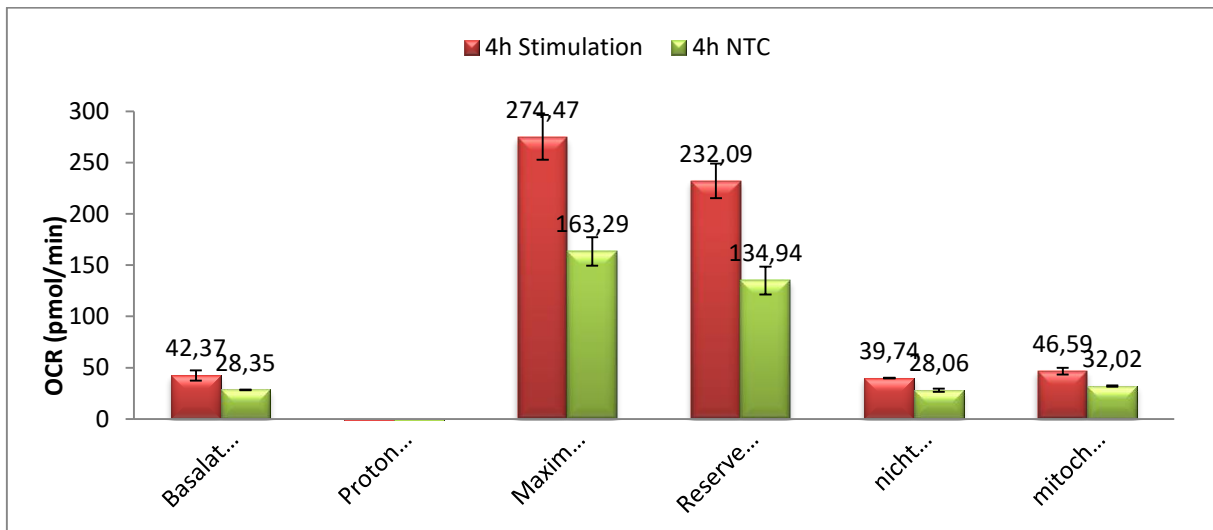


Abbildung 45: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatemung, Protonenleck, Maximalatemung, Reserveatemungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion

Die nicht-stimulierten Zellen verzeichnen bei allen Größen der mitochondrialen Atmung niedrigere Werte als die stimulierten Zellen. Am Deutlichsten fällt dies bei der Maximalatmung und der Reserveatmungskapazität auf.

In der *Tabelle 26* sowie in den *Abbildungen 46* und *47* sind die prozentuale Reserveatmungskapazität und die Kopplungseffizienz zu finden.

**Tabelle 26: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %**

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	4h Stimulation	667,81	114,36
	4h Stimulation	630,82	106,24
	4h NTC	604,85	113,51
	4h NTC	546,52	112,36
<hr/>			
Mittelwert	4h Stimulation	649,32	110,30
Standardabweichung		26,16	5,74
Variationskoeffizient		4,03%	5,21%
<hr/>			
Mittelwert	4h NTC	575,69	112,93
Standardabweichung		41,25	0,81
Variationskoeffizient		7,17%	0,72%

Die Werte der Variationskoeffizienten beider Gruppen liegen sowohl für die Reserveatmungskapazität als auch für die Kopplungseffizienz auf einem niedrigen Niveau und bewegen sich in einem Bereich zwischen 0,81% (Kopplungseffizienz unstimulierte Zellen) und 7,17% (Reserveatmungskapazität unstimulierte Zellen).

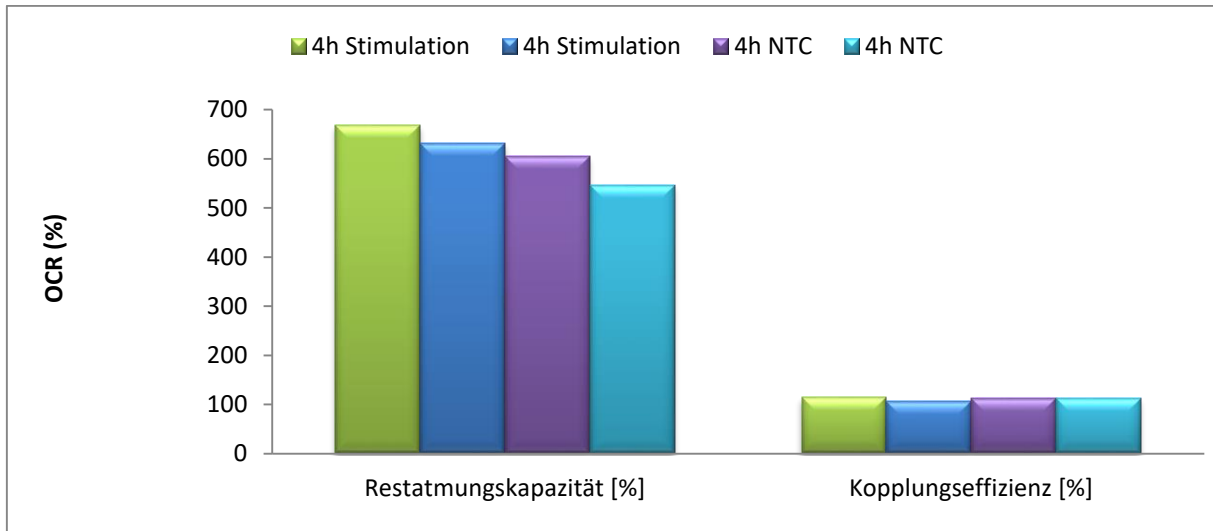


Abbildung 46: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

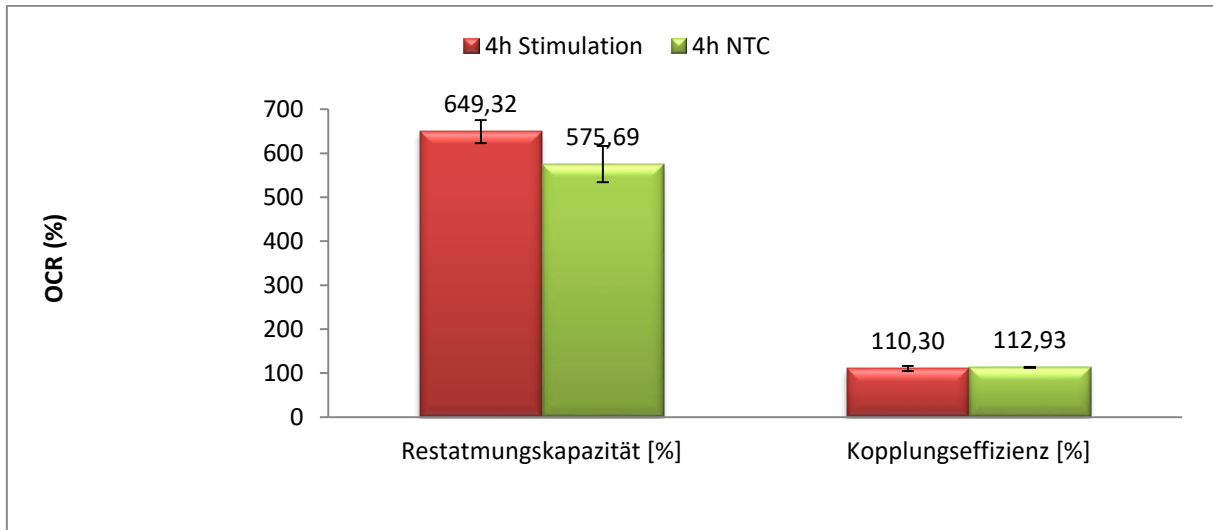


Abbildung 47: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Die Reserveatmungskapazität fällt bei den stimulierten Zellen etwas höher aus, wohingegen die nicht-stimulierten Zellen eine leicht höhere Kopplungseffizienz verzeichnen.

Der Bioenergetische Gesundheitsindex ergibt sich für die untersuchten Zellen zu den in *Tabelle 27* stehenden Werten.

*Tabelle 27: 4h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)*

		BHI
	4h Stimulation	2,39
	4h Stimulation	2,48
	4h NTC	2,21
	4h NTC	2,17
<hr/>		
Mittelwert	4h Stimulation	2,43
Standardabweichung		0,06
Variationskoeffizient		2,65%
<hr/>		
Mittelwert	4h NTC	2,19
Standardabweichung		0,03
Variationskoeffizient		1,30%

Stimulierte und unstimulierte Zellen besitzen niedrige Standardabweichungen (0,06 bzw. 0,03), die zu niedrigen Variationskoeffizienten führen (2,65% bzw. 1,30%). Der BHI der Negativkontrolle fällt dabei etwas geringer aus als der BHI der stimulierten Zellen.

### 3.2.4. 24h Stimulation

Der Verlauf der mitochondrialen Atmung der 24 Stunden stimulierten und nicht-stimulierten PMA-differenzierten Zellen ist in der folgenden Abbildung zu sehen:

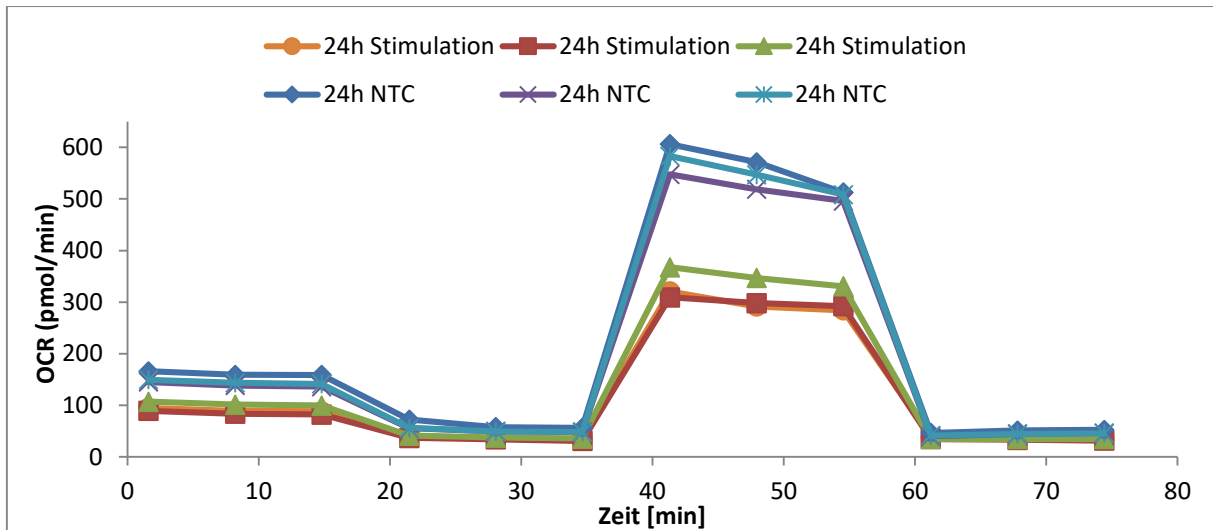


Abbildung 48: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mitochondriale Atmung in pmol O<sub>2</sub>/min

Die Dreifachbestimmungen der stimulierten und nicht-stimulierten Zellen sind jeweils homogen. Sie weisen Unterschiede dahingehend auf, dass die Negativkontrolle erhöhte Werte, vor allem im Bereich der Maximalatmung, besitzt.

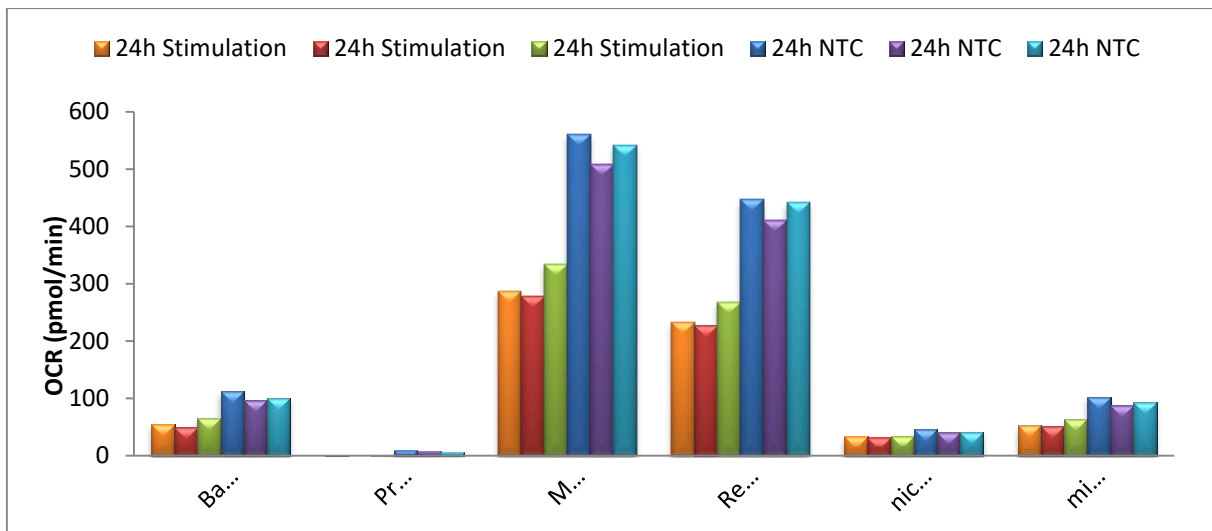
Die *Tabelle 28* zeigt Basalatmung, Protonenleck, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion der PMA-Zellen mit den entsprechenden Mittelwerten und Standardabweichungen.

**Tabelle 28: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung (BA), Protonenleck (PL), Maximalatmung (MA), Reserveatmungskapazität (RAK), nicht-mitochondriale Atmung (nmA) und mitochondriale ATP-Produktion (mATP) in pmol O<sub>2</sub>/min**

		BA [pmol O <sub>2</sub> /min]g	PL [pmol O <sub>2</sub> /min]	MA [pmol O <sub>2</sub> /min]	RAK [pmol O <sub>2</sub> /min]	nmA [pmol O <sub>2</sub> /min]	mATP [pmol O <sub>2</sub> /min]
	24h Stimulation	55,10	1,77	287,57	232,48	33,30	53,33
	24h Stimulation	50,43	-0,81	277,47	227,04	31,70	51,23
	24h Stimulation	64,83	1,12	332,92	268,09	34,59	63,71
	24h NTC	112,13	9,96	559,62	447,49	46,54	102,17
	24h NTC	96,11	8,49	507,72	411,61	39,88	87,62
	24h NTC	100,17	6,80	541,59	441,42	41,33	93,36
<hr/>							
Mittelwert	24h Stimulation	56,78	0,69	299,32	242,54	33,20	56,09
Standard- abweichung		7,35	1,34	29,53	22,30	1,45	6,68
Variationsko- effizient		12,94%	193,01%	9,87%	9,19%	4,36%	11,91%
<hr/>							
Mittelwert	24h NTC	102,80	8,42	536,31	433,51	42,59	94,38
Standard- abweichung		8,33	1,58	26,35	19,21	3,50	7,33
Variationsko- effizient		8,10%	18,77%	4,91%	4,43%	8,23%	7,76%

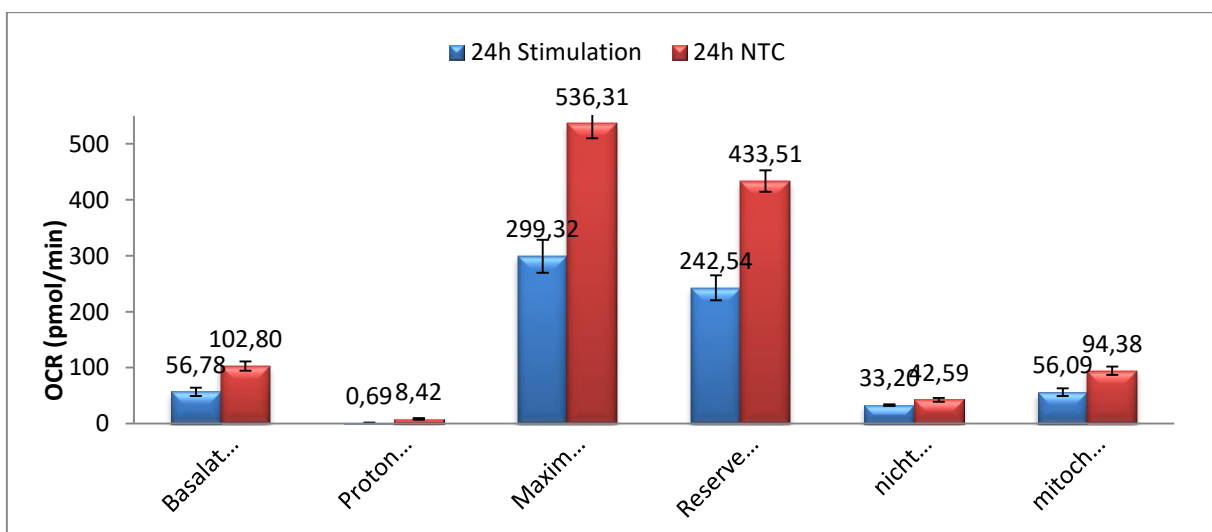
Aufgrund des negativen Protonenlecks in Well C (stimulierte Zellen) ergibt sich ein nicht aussagekräftiger Mittelwert, der mit einer geringen Standardabweichung zu einem unrealen Variationskoeffizienten von 193,01% führt. Davon abgesehen besitzt die Basalatmung mit 12,94% den höchsten Wert der stimulierten Zellen, gefolgt von der mitochondrialen ATP-Produktion mit 11,91%. Maximalatmung und Reserveatmungskapazität weisen ähnliche Werte auf (9,87% bzw. 9,19%), während die nicht-mitochondriale Atmung mit 4,36% den geringsten Variationskoeffizienten

verzeichnet. Bei den nicht-stimulierten Zellen findet sich dieser mit 4,43% bei der Reserveatmungskapazität. Mitochondriale ATP-Produktion, Basalatmung und nicht-mitochondriale Atmung bewegen sich in einem Bereich zwischen 7,76% und 8,23%. In den *Abbildungen 49* und *50* sind die Werte aus Tabelle 25 graphisch aufgetragen.



*Abbildung 49: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion in pmol O<sub>2</sub>/min*

Im Vergleich zu Well B und C liefert Well D bei fast allen Größen die höchsten Werte der stimulierten Zellen. Well E verzeichnet bei der Negativkontrolle die höchsten Werte.



*Abbildung 50: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert (in pmol O<sub>2</sub>/min) und Standardabweichung für Basalatmung, Protonenleck, Maximalatmung, Reserveatmungskapazität, nicht-mitochondriale Atmung und mitochondriale ATP-Produktion*

Entsprechend des Verlaufes der mitochondrialen Atmung ergeben sich für die unstimulierten Zellen überall höhere Werte als für die stimulierten Zellen. Die prozentuale Reserveatmungskapazität und die Kopplungseffizienz sind in der *Tabelle 29* und den *Abbildungen 51* und *52* dargestellt.

*Tabelle 29: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %*

		Reserveatmungskapazität [%]	Kopplungseffizienz [%]
	24h Stimulation	521,94	96,78
	24h Stimulation	550,25	101,60
	24h Stimulation	513,52	98,27
	24h NTC	499,09	91,12
	24h NTC	528,26	91,17
	24h NTC	540,70	93,21
<hr/>			
Mittelwert	24h Stimulation	528,57	98,89
Standardabweichung		19,24	2,47
Variationskoeffizient		3,64%	2,49%
<hr/>			
Mittelwert	24h NTC	522,68	91,83
Standardabweichung		21,36	1,19
Variationskoeffizient		4,09%	1,30%

Die Variationskoeffizienten der nicht-stimulierten Zellen fallen für die Kopplungseffizienz am niedrigsten (1,30%) und für die Reserveatmungskapazität am höchsten (4,09%) aus. Die Werte der stimulierten Zellen liegen in diesem Intervall. Auffällig sind die Standardabweichungen der Kopplungseffizienz, die geringer sind als die der Reserveatmungskapazität.

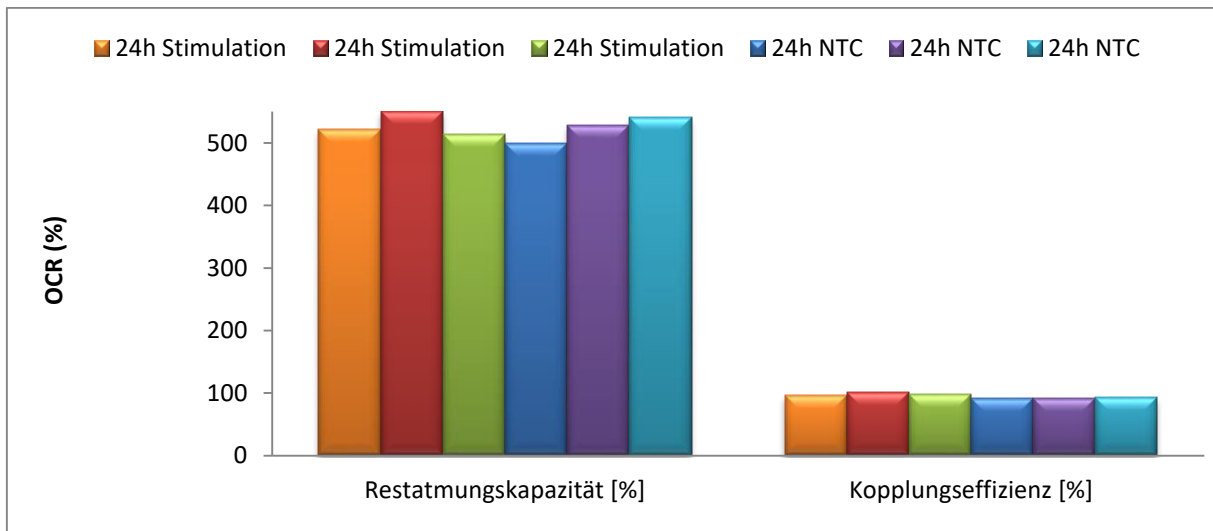


Abbildung 51: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Die Kopplungseffizienz ist sehr homogen verteilt, während bei der Reserveatmungskapazität leichte Differenzen innerhalb jeder Gruppe zu sehen sind.

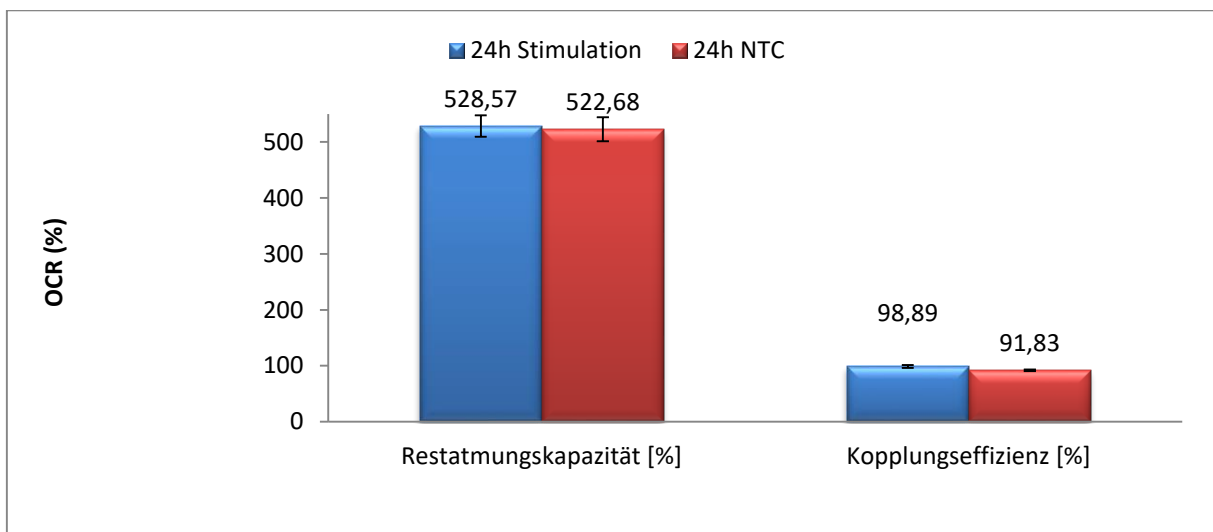


Abbildung 52: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Mittelwert und Standardabweichung für Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz in %

Sowohl die Reserveatmungskapazität als auch die Kopplungseffizienz sind für stimulierte und unstimulierte Zellen annähernd gleich, wobei die stimulierten Zellen nur marginal höhere Werte aufweisen.

Nachfolgend stehen in der *Tabelle 30* die Werte des Bioenergetischen Gesundheitsindex‘.

*Tabelle 30: 24h Stimulation der PMA-differenzierten Zellen: Bioenergetischer Gesundheitsindex (BHI)*

		BHI
	24h Stimulation	2,32
	24h Stimulation	2,56
	24h Stimulation	2,64
	24h NTC	1,99
	24h NTC	2,03
	24h NTC	2,17
<hr/>		
Mittelwert	24h Stimulation	2,51
Standardabweichung		0,17
Variationskoeffizient		6,68%
<hr/>		
Mittelwert	24h NTC	2,06
Standardabweichung		0,09
Variationskoeffizient		4,42%

Der BHI der stimulierten Zellen beträgt 2,51 und liegt somit höher als der BHI der nicht-stimulierten Zellen (2,06). Durch die leichte Streuung der Werte der Wells B bis D ergibt sich ein Variationskoeffizient von 6,68%, der größer ist als der der Negativkontrolle (4,42%).

## 4. Diskussion

### 4.1. Auswertung der THP-1-Suspensionszellen

Als Grundlage zur Beurteilung eines möglichen Einflusses der Kleinschen Felder auf den Metabolismus von THP-1-Zellen über verschiedene Zeiten bietet sich zunächst eine Betrachtung der Entwicklung der mitochondrialen Atmung der „unbehandelten“, also nicht-stimulierten Zellen an. Die nicht-mitochondriale Atmung, das Protonenleck, die Basalatmung, die mitochondriale ATP-Produktion und die Maximalatmung sowie die Reserveatmungskapazität der unstimulierten Zellen verzeichnen einen Anstieg bis zu einem Zeitpunkt von vier Stunden. Da THP-1-Zellen Tumorzellen sind, die stark proliferieren, gehen die erhöhten Werte der Parameter der mitochondrialen Atmung auf ein Wachstum der Zellen zurück. Nach vier Stunden sinken diese Werte mit Ausnahme der Reserveatmungskapazität etwas und zeigen im Bereich zwischen acht und 24 Stunden bis auf die Maximalatmung nur noch geringfügige Änderungen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass hier eine Wachstumskinetik beobachtet wurde und die THP-1-Zellen nach etwa vier Stunden von einer Wachstums- in eine stationäre Phase übergehen.

Die mit den Magnetstreifen stimulierten Zellen zeigen eine Entwicklung der mitochondrialen Atmung, die sich in Teilen von der der nicht-stimulierten Zellen unterscheidet (vgl. *Abbildungen 31* und *32*). In der ersten Stunde steigen alle Größen an, wobei die Maximalatmung und die Reserveatmungskapazität den größten Anstieg besitzen. Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen führt die Stimulation der Zellen zu deutlich erhöhten Werten: die Maximalatmung beträgt nach einer Stunde mit einem OCR von 500,06 pmol O<sub>2</sub>/min das 3,3fache, während die Reserveatmungskapazität auf das 5,5fache (360,99 pmol O<sub>2</sub>/min) ansteigt (vgl. *Tabelle 7*). Nach einer Stunde fallen alle Größen der mitochondrialen Atmung wieder ab und erreichen zum Zeitpunkt von vier Stunden Werte, die alle unter denen der nicht-stimulierten Zellen nach vier Stunden liegen (vgl. *Tabelle 10*). Im Verlauf bis acht Stunden steigen die nicht-mitochondriale Atmung, das Protonenleck, die Basalatmung, die mitochondriale ATP-Produktion und die Maximalatmung sowie die Reserveatmungskapazität wieder an. Verglichen mit den unstimulierten Zellen sind

die Werte bei acht Stunden mit Ausnahme der mitochondrialen ATP-Produktion etwas höher (vgl. *Tabelle 13*).

Die prozentuale Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz der nicht-stimulierten THP-1-Zellen schwanken über den untersuchten Zeitraum von 24 Stunden. Während des Wachstums der Zellen in den ersten vier Stunden fällt die Reserveatmungskapazität von 213,34% auf 170,21% (vgl. *Tabellen 5 und 11*), bevor sie bei acht Stunden das Ausgangsniveau wieder erreicht (214,31%; vgl. *Tabelle 14*) und sich nach 24 Stunden mit 168,42% ungefähr dem Wert nach vier Stunden angleicht (vgl. *Tabellen 11 und 17*). Der Trend der Kopplungseffizienz ist bis vier Stunden ähnlich und fällt ebenfalls ab (vgl. *Tabellen 5, 8 und 11*). Bis 24 Stunden steigen die Werte jedoch wieder und liegen dann mit 88,97% fast beim Ausgangswert von 89,86% (vgl. *Tabellen 5 und 17*).

Die stimulierten THP-1-Zellen weisen bei der Reserveatmungskapazität Werte auf, die im Gegensatz zu den unstimulierten Zellen nach einer Stunde angestiegen sind (vgl. *Tabelle 8*). Nach den vier Stunden folgen sie jedoch dem Schema der nicht-stimulierten Zellen und steigen bei acht Stunden an, bevor sie nach 24 Stunden wieder abfallen. Mit 190,77% liegen die stimulierten Zellen nur leicht höher als die unstimulierten Zellen und somit näher am Ausgangswert von 213,34% (vgl. *Tabellen 5 und 17*). Die Kopplungseffizienz sinkt nach Beginn der Stimulation der Zellen zunächst im Zeitraum bis acht Stunden (vgl. *Tabellen 5, 8, 11 und 14*), ehe mit 89,56% nach 24 Stunden ein Wert erreicht wird, der nahe beim Ausgangsniveau liegt (89,86; vgl. *Tabellen 5 und 17*).

Der Bioenergetische Gesundheitsindex (BHI) der nicht-stimulierten Zellen korreliert mit der Wachstumskinetik dahingehend, dass während des Wachstums der Zellen, bei dem die Parameter der mitochondrialen Atmung steigen, der BHI von 1,21 auf 0,93 sinkt (vgl. *Tabellen 6 und 12*) und dieser nach Beginn der stationären Phase im Gegensatz zur sinkenden mitochondrialen Atmung ansteigt und mit 1,37 nach 24 Stunden einen höheren Wert erreicht als zu Beginn (vgl. *Tabelle 18*). Die Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Berechnungsgrundlage des BHI und der Entwicklung der beteiligten Parameter im Laufe der Untersuchung. Ein geringerer BHI geht zum Beispiel mit einem kleineren Quotienten im dekadischen Logarithmus

einher. Im Bereich zwischen null und einer Stunde erhöhen sich die im Zähler stehenden Werte der Reserveatmungskapazität und der mitochondrialen ATP-Produktion insgesamt um den Faktor 2,8, während die im Nenner befindlichen Werte des Protonenlecks und der nicht-mitochondrialen Atmung um den Faktor 3,2 steigen. Dies führt zu einem 8%ig geringeren BHI nach einer Stunde als zu Beginn. Im Zeitraum von einer bis vier Stunden verändern sich die Werte im Zähler um den Faktor 4 und im Nenner um den Faktor 6,2. Der BHI fällt nach vier Stunden um weitere 16%. Ein Vergleich der Tabellen 4 und 7 zeigt auf, dass gegen Ende der Wachstumsphase (zwischen einer und vier Stunden) Reserveatmungskapazität, mitochondriale ATP-Produktion und nicht-mitochondriale Atmung um das Doppelte ansteigen; das Protonenleck sogar um das Dreifache. Der Anstieg des BHI nach acht Stunden auf 1,32 (vgl. *Tabelle 15*) lässt sich darauf zurückführen, dass die Reserveatmungskapazität im Gegensatz zu Protonenleck, nicht-mitochondrialer Atmung und mitochondrialer ATP-Produktion, die wieder sinken, noch weiter ansteigt.

Die stimulierten Zellen verzeichnen nach einer Stunde einen BHI von 1,58 (vgl. *Tabelle 9*), dessen Steigerung im Vergleich zum Startwert auf dem starken Anstieg der Maximalatmung und der mitochondrialen ATP-Produktion und der daraus resultierenden Reserveatmungskapazität beruht (vgl. *Tabelle 4* und *7*). Da im Zeitraum bis vier Stunden das Protonenleck und die nicht-mitochondriale Atmung nur geringfügig gesunken sind, die Reserveatmungskapazität jedoch stark eingebrochen ist und in etwa auf dem Niveau der mitochondrialen ATP-Produktion liegt, verringert sich der BHI um 26% auf 1,17 (vgl. *Tabelle 12*). Im weiteren Verlauf bis acht Stunden fällt der BHI weiter ab, bevor er aufgrund der weiterhin ansteigenden mitochondrialen ATP-Produktion einen Wert von 1,51 erreicht (vgl. *Tabelle 18*). Hierzu trägt auch der Umstand bei, dass das Protonenleck und die nicht-mitochondriale Atmung wieder sinken und sich ihrem Anfangsniveau annähern (vgl. *Tabelle 4* und *17*).

## 4.2. Auswertung der PMA-differenzierten THP-1-Zellen

Anders als bei den THP-1-Zellen lässt sich für die PMA-differenzierten Zellen keine Kinetik der mitochondrialen Atmung als Vorbetrachtung nutzen. Die Suspensionskultur der THP-1-Zellen erfuhr durch wöchentliche Passagierung und Fütterung ein kontinuierliches Wachstum. Im Gegensatz dazu wurden THP-1-Zellen zur Ausdifferenzierung mit PMA unregelmäßig und nur in Vorbereitung einer anstehenden Stimulation angesetzt. Da ihr Wachstum abgeschlossen ist, sobald sie vollständig zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert sind, beträgt ihre Lebenszeit nur wenige Tage. Verschiedene Ausprägungen der mitochondrialen Atmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten lassen sich bei den PMA-differenzierten Zellen daher nur bedingt in einen Zusammenhang setzen. Lediglich ein Vergleich der stimulierten und nicht-stimulierten Zellen zu jedem Zeitpunkt kann erfolgen.

Einstündig stimulierte PMA-differenzierte Zellen weisen im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen durchgehend höhere Werte des OCR auf (vgl. *Abbildung 38*). Auffällig ist der große Unterschied bei der Maximalatmung und der Reserveatmungskapazität, der 287,28 pmol O<sub>2</sub>/min bzw. 258,97 pmol O<sub>2</sub>/min beträgt. Das Protonenleck nimmt bei allen Zellen negative Werte an, die keinen realen Zustand widerspiegeln, da dies bedeuten würde, dass Protonen trotz des sich nicht auflösenden Gradienten im perimitochondrialen Spalt nach der Zugabe von Oligomycin durch die Cytochromkette diffundieren. Erklären ließ sich dieses Phänomen mit einer zu geringen Konzentration des Oligomycins, sodass vereinzelt Protonen durch die ATP-Synthase in die Matrix gelangen und deshalb weiter Protonen in den Intermembranraum diffundieren, um den Gradienten aufrecht zu erhalten. Die ATP-Produktion der stimulierten PMA-Zellen liegt doppelt so hoch wie bei den Zellen ohne Stimulation. Die größte Steigerung erfährt die nicht-mitochondriale Atmung, die auf das 2,8fache ansteigt (vgl. *Tabelle 22*). Die prozentuale Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz der stimulierten Zellen nehmen die 1,5fachen Werte der nicht-stimulierten Zellen an (vgl. *Tabelle 23* und *Abbildung 42*). Aufgrund der höher liegenden Werte der Parameter der mitochondrialen Atmung besitzen die stimulierten PMA-Zellen den höheren BHI; das Protonenleck wird hierbei zur Berechnung des BHI für alle negativen Werte auf eins gesetzt (vgl. *Tabelle 24*).

Werden PMA-differenzierte Zellen vier Stunden lang stimuliert, so verzeichnen sie eine höhere mitochondriale Atmung als nicht-stimulierte Zellen (vgl. *Abbildung 43*). Wie zuvor werden für das Protonenleck bei allen Zellen negative Werte gemessen. Maximalatmung und Reserveatmungskapazität steigen durch die Stimulation jeweils auf das 1,7fache der unstimulierten Zellen an und besitzen die größte Differenz zwischen beiden Zellkulturen (vgl. *Tabelle 25*). Während die prozentuale Reserveatmungskapazität der stimulierten Zellen nur 11,3% höher liegt als die der unstimulierten Zellen, befinden sich beide Kopplungseffizienzen auf einem sehr ähnlichen Niveau (vgl. *Tabelle 26* und *Abbildung 47*). Die Stimulation der Zellen führt zu einem höheren BHI (vgl. *Tabelle 27*).

Eine Stimulation von PMA-differenzierten Zellen über 24 Stunden führt zu einer mitochondrialen Atmung, die geringer ausfällt als bei den nicht-stimulierten Zellen (vgl. *Abbildung 48*). Somit nehmen auch alle Parameter kleinere Werte an. Der kleinste Unterschied ist mit 9,39 pmol O<sub>2</sub>/min bei der nicht-mitochondrialen Atmung zu finden. Am weitesten liegend die Werte der Basalatmung auseinander, bei der die stimulierten Zellen nur 55,2% der nicht-stimulierten Zellen betragen (vgl. *Tabelle 28*). Der Unterschied bei der prozentualen Reserveatmungskapazität und Kopplungseffizienz zwischen den beiden Zellkulturen fällt sehr gering aus und beträgt nur 1,1% bzw. 7,1% der Werte der stimulierten Zellen (vgl. *Tabelle 29* und *Abbildung 52*). Im Gegensatz zur mitochondrialen Atmung besitzen die nicht-stimulierten Zellen einen geringeren BHI als die Zellen mit Stimulation (vgl. *Tabelle 30*).

### 4.3. Fazit

Stimulierte und nicht-stimulierte THP-1-Suspensionszellen zeigen deutliche Unterschiede bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse. Ausgehend von der Wachstumskinetik der unstimulierten THP-1-Zellen scheint eine Stimulierung der Zellen mit den eingesetzten polymorphen permanenten Magnetfeldern großen Einfluss auf die messbaren Größen der mitochondrialen Atmung zu besitzen. Nach

einer Stunde ist ein Anstieg des OCR zu verzeichnen, dessen stark erhöhte Werte gerade bei der Maximalatmung und der Reserveatmungskapazität sich demnach auf die Einwirkung der Kleinschen Felder zurückführen lassen. Diese regen die Zellen an und induzieren eine Reaktion, die ähnlich wie eine Stresssituation eine gesteigerte Aktivität der THP-1-Zellen zur Folge hat. Die nicht-mitochondriale Atmung erreicht durch die Stimulation fast das doppelte Niveau der nicht-stimulierten Zellen (vgl. *Tabelle 7*), was bedeutet, dass auch sauerstoffverbrauchende Prozesse, die nicht an der Energieproduktion in den Mitochondrien beteiligt sind, unter Vernachlässigung des Wachstums vermehrt ablaufen. Die ATP-Produktion steigt um das mehr als dreifache und liegt nach einer Stunde um das Anderthalbfache höher als bei den Zellen ohne Stimulation (vgl. *Tabellen 4 und 7*). Zusammen mit der stark gestiegenen Maximalatmung resultiert eine hohe Reserveatmungskapazität, die den Schluss zulässt, dass die maximal mögliche Energieproduktion der Mitochondrien durch den Einsatz Kleinscher Felder erheblich gesteigert wird. Durch die kurzzeitige enorme Erhöhung der Aktivität der Zellen kommt es im Verlauf bis vier Stunden zu einem Rückgang der mitochondrialen Atmung, die trotz Wachstum auf ein Minimum heruntergefahren wird. Der starken Beanspruchung der metabolischen Prozesse der Zellen in der ersten Stunde folgt somit eine notwendige Erholungsphase. Nach Erreichen der stationären Phase bewirkt die Stimulation zwar einen erneuten Anstieg aller gemessenen mitochondrialen Größen, jedoch besitzen diese nach acht Stunden mit dem beispielsweise 1,4fachen der Reserveatmungskapazität nur unwesentlich höhere Werte als die nicht-stimulierten Zellen. In der stationären Phase kann folglich nur noch eine leichte Steigerung der mitochondrialen Atmung durch eine Stimulation mit Kleinschen Feldern erreicht werden. Dies spiegelt sich auch in den Werten nach 24 Stunden wider, die bei den stimulierten Zellen größtenteils nah an denen der unstimulierten Zellen liegen (vgl. *Tabelle 17*).

Die Reserveatmungskapazität der nicht-stimulierten THP-1-Zellen lässt sich nur schwer in Zusammenhang mit den Wachstumsphasen setzen. Fallende Werte während des Wachstums und der stationären Phase stehen einer einmaligen Steigerung der Reserveatmungskapazität beim Übergang zwischen den beiden Phasen gegenüber. Die Kopplungseffizienz der unstimulierten Zellen sinkt im Zuge des Zellwachstums und stabilisiert sich nach Erreichen der stationären Phase wieder. Bei den stimulierten Zellen ähneln sich die Verläufe der mitochondrialen Atmung und

der Reserveatmungskapazität im Hinblick auf Anstieg und Abfall des OCR. Die Kopplungseffizienz der stimulierten Zellen hingegen spiegelt keine Ähnlichkeit zur mitochondrialen Atmung wieder.

Der Vergleich des BHI der THP-1-Zellen mit und ohne Stimulation zeigt bei erster Betrachtung eine Abhängigkeit vom Wachstum der Zellen. Ohne Stimulus steigen die Größen der mitochondrialen Atmung während der ersten Phase der Vermehrung der Zellen zwar an, jedoch sinkt der BHI. Zurückzuführen lässt sich dies wie bereits beschrieben auf die Kombination der sich unterschiedlich entwickelnden Reserveatmungskapazität, der mitochondrialen ATP-Produktion, der nicht-mitochondrialen Atmung und des Protonenlecks. Wird die stationäre Phase erreicht steigt der BHI langsam wieder an. Die großen Schwankungen der mitochondrialen Atmung der stimulierten Zellen lassen sich ansatzweise auch beim BHI beobachten. Im Verlauf der ersten Stunde steigt der BHI auf das 1,3fache des Ausgangswertes (1,21; vgl. *Tabellen 6 und 9*) und fällt während der Erholung der Zellen unter diesen. Trotz folgender ansteigender mitochondrialer Atmung sinkt der BHI weiter, bevor er nach 24 Stunden wieder höher liegt als bei den nicht-stimulierten Zellen. Basierend auf diesen Ergebnissen eignet sich eine Auswertung des BHI nur bedingt für die Beurteilung des metabolischen Potentials von Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg. Eine Aussage über die zelluläre Aktivität kann bloß zu einem einzelnen Zeitpunkt während einer Entwicklung getroffen werden. Hinzu kommt der Umstand, dass durch die Bildung von Produkten im Bruch des dekadischen Logarithmus kleine Unterschiede in den Messungen einen viel größeren Einfluss auf das Ergebnis des BHI zur Folge haben.

Die Wirkung der Kleinschen Felder auf die PMA-differenzierten Zellen lässt sich nur eingeschränkt beurteilen, da für einen aussagekräftigen Vergleich ein Test für jede Stimulationsdauer mit den Zellen vor und nach der Stimulation hätte durchgeführt werden müssen. Grund ist eine nicht ermittelbare Kinetik der makrophagenähnlichen Zellen, die einzeln angezüchtet wurden. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die Stimulation mit Kleinschen Feldern für eine und für vier Stunden zu einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität geführt hat, die folglich auch das metabolische Potential der Zellen gesteigert hat. Eine Stimulierung über 24 Stunden hat hingegen einen umgekehrten Effekt und lässt die mitochondriale Atmung der

Zellen sinken. Während der BHI der Zellen nach einer- und vierstündiger Stimulation mit der mitochondrialen Aktivität korreliert, ist das nach 24 Stunden nicht mehr der Fall. Verantwortlich hierfür ist erneut die Berechnungsgrundlage des BHI (s.o.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die permanenten polymorphen Magnetfelder in Form der Kleinschen Felder einen mess- und sichtbaren Einfluss auf die untersuchten THP-1-Suspensionzellen und die PMA-differenzierten THP-1-Zellen haben. Eine zeitliche Entwicklung dieser Wirkung kann nur für die in Suspensionskultur wachsenden THP-1-Zellen sinnvoll analysiert werden. Die Beurteilung einer sich verändernden Bioenergetik allein anhand des 'Bioenergetischen Gesundheitsindex' (BHI) ist nicht ausreichend. Die Größen der mitochondrialen Atmung, insbesondere Maximalatmung, mitochondriale ATP-Produktion und Reserveatmungskapazität, eignen sich zur Untersuchung über einen längeren Zeitraum besser, um Aussagen über das metabolische Potential der Zellen treffen zu können. THP-1-Zellen, die mit PMA zu adhären Zellen ausdifferenziert werden, sind für kontinuierliche Tests mit Kleinschen Feldern eher ungeeignet, da aufgrund ihrer begrenzten Lebenszeit mit ihnen nur eingeschränkt gearbeitet werden kann. Außerdem müssen sie für jeden Versuch neu angezchtet werden und sind somit abhängig von der Entwicklung der Suspensionskultur der THP-1-Zellen. Gerade die Ergebnisse beider Zelltypen nach einer Stunde Stimulation legen die Vermutung nahe, dass durch die Kleinschen Felder die über die mitochondriale Atmung gemessene Aktivität der Zellen erheblich gesteigert werden kann. Dieser Effekt fällt jedoch im Laufe mehrerer Stunden immer geringer aus.

Bei einer Wiederholung oder Weiterführung der Versuche sollte beachtet werden, THP-1-Zellen nicht länger als bis zur Passage 20 zu nutzen. Stimulationen und Tests mit Zellen aus späteren Passagen lieferten Ergebnisse, die kaum noch Reaktion der Zellen auf die Inhibitoren der Atmungskette zeigten. Außerdem könnten Untersuchungen mit weiteren Zelllinien durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede bei der mitochondrialen Atmung festzustellen. Die Stimulation über verschiedene Zeiträume erfolgte nur von Zellen, die der stetig wachsenden Suspensionskultur entnommen und nach der Untersuchung im *Seahorse* entsorgt wurden. Interessant wären deshalb Versuche, bei denen Zellen mehrfach stimuliert werden.

## Literaturverzeichnis

Agilent Technologies: Report Generator User Guide. Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test.

Boujard, Daniel; Anselme, Bruno; Cullin, Christophe; Raguénès-Nicol, Céline; Lechowski, Sandra (2014): Zell- und Molekularbiologie im Überblick. Berlin: Springer Spektrum.

Chacko, Balu K.; Kramer, Philip A.; Ravi, Saranya; Benavides, Gloria A.; Mitchell, Tanecia; Dranka, Brian P. et al. (2014): The Bioenergetic Health Index. A new concept in mitochondrial translational research. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 127 (6), S. 367–373. DOI: 10.1042/CS20140101.

Chen, Xiulan; Wei, Shasha; Yang, Fuquan (2012): Mitochondria in the pathogenesis of diabetes. A proteomic view. In: *Protein & cell* 3 (9), S. 648–660. DOI: 10.1007/s13238-012-2043-4.

Franco-Iborra, Sandra; Vila, Miquel; Perier, Celine (2016): The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis. Where Are We at? In: *The Neuroscientist* 22 (3), S. 266–277. DOI: 10.1177/1073858415574600.

Hofmann, Sabine; Bauer, Matthias F. (2005): Mitochondrial Disorders. In: John Wiley & Sons (Hg.): *Encyclopedia of Life Sciences*.

König, Brigitte (2016): Bioenergetik. Der Goldstandard zur Beurteilung einer mitochondrialen Dysfunktion. In: *OM & Ernährung* (156).

Lee, Junghee; Kim, Yunha; Liu, Tian; Hwang, Yu Jin; Hyeon, Seung Jae; Im, Hyeonjoo et al. (2017): SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. In: *Aging cell*. DOI: 10.1111/accel.12679.

Lemieux, H.; Hoppel, C. L. (2009): Mitochondria in the human heart. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41 (2), S. 99–106. DOI: 10.1007/s10863-009-9211-0.

Mascotti, K.; McCullough, J.; Burger, S. R. (2000): HPC viability measurement. Trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. In: *Transfusion* 40 (6), S. 693–696. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2000.40060693.x.

Plattner, Helmut; Hentschel, Joachim (2011): Zellbiologie. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Zong, Wei-Xing; Rabinowitz, Joshua D.; White, Eileen (2016): Mitochondria and Cancer. In: *Molecular cell* 61 (5), S. 667–676. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.011.