

Aus dem Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Universität zu Köln
Institut für vegetative Physiologie
Geschäftsführende Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. rer. Nat. T. Korotkova

Einfluss mitochondrialer DNA-Mutationen auf das tumorigene Potential von Hodgkin- und Reed- Sternberg-Zellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sophie Tabea Haumann
aus Gießen

promoviert am 26. Juni 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. J. Wiesner
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. J. Bröckelmann

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift 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.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente, ausgenommen der Tierexperimente, sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. Hue-Tran Hornig-Do und Frau Dr. Angela Bieling von mir selbst ausgeführt worden. Ich erhielt technische Unterstützung durch Frau Maria Burst und Frau Katrin Lanz.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 19.01.2025

Unterschrift:

Danksagung

Ich danke Prof. Rudolf Wiesner für das jahrelange Warten auf die Verfassung meiner Promotionsschrift sowie selbstverständlich noch mehr für großartige Unterstützung und Betreuung und die Möglichkeiten diese Forschungstätigkeit in seinem Labor und in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Ebenso danke ich Tran für das Viele, was ich von ihr im Labor lernen durfte.

Ich danke meiner Familie, allen Voran meinem Mann Thomas, für die immerwährende Unterstützung bei meinen Plänen. Und natürlich unseren Töchtern Alma, Romy und Yoko, ihr seid meine größte Motivation. Ein ganz herzlicher Dank auch an meine Eltern und meine Schwester Hannah für die Möglichkeiten, die ihr mir schafft und die tatkräftige (emotionale) Unterstützung.

Für meine Töchter

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	7
2. EINLEITUNG	8
2.1. HODGKIN LYMPHOM	8
2.1.1. Epidemiologie	8
2.1.2. Histologische Einteilung	8
2.1.3. Biologie des klassischen Hodgkin Lymphoms	8
2.1.4. Klinik und Therapie	9
2.2. MITOCHONDRIEN UND ENERGIEHAUSHALT	9
2.2.1. Glykolyse	9
2.2.2. Die mitochondrialen Atmungskette	10
2.2.3. Genetik der Mitochondrien	12
2.3. MITOCHONDRIEN IN TUMORERKRANKUNGEN	14
2.3.1. Der Warburg Effekt und metabolische Alterationen in Tumorzellen	14
2.3.2. Mitochondriale DNA Mutationen in Tumorerkrankungen	15
2.4. FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT	15
3. MANUSKRIFT DER PUBLIKATION	17
4. DISKUSSION	28
4.1. mtDNA Mutationen in Tumoren	28
4.2. mtDNA Mutationen in Tumoren und ihre funktionellen Auswirkungen	28
4.3. mtDNA Mutationen zeigen unterschiedliche funktionelle Auswirkungen	29
4.4. Retrograde Signalkaskaden und deren Einfluss auf die zellulären Reaktionen auf mtDNA Mutationen	30
4.5. cHLZellen zeigen eine Steigerung der mitochondrialen Biomasse	31
4.6. Relevanz der gesteigerten mitochondrialen Biomasse für die Tumorentstehung	31
4.7. Ausblick	32

5.	LITERATURVERZEICHNIS	33
6.	ANHANG	38
6.1.	Abbildungsverzeichnis	38

Abkürzungsverzeichnis

ATP – Adenosintriphosphat

ADP- Adenosindiphosphat

BP - Basenpaare

cHL – klassisches Hodgkin-Lymphom

COX – Cytochrom C Oxidase

DNA - Desoxyribonukleinsäure

FAD – Flavin-Adenin-Dinukleotid

GHSK – German Hodgkin Studygroup – Deutsche Hodgkin Studiengruppe

HK - Hexokinase

HL – Hodgkin Lymphom

HRS-Zellen- Hodgkin und Reed-Sternberg-Zellen

JAK - Januskinase

mtDNA -mitochondriale Desoxyribonukleinsäure

NAD – Nicotinamidadenindinukleotid

ND1-ND6 - NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase-Ketten-Protein 1-6

ND4L - NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase-Ketten-Protein-4L

NF-kappa-B – Nukleärer Faktor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ von aktivierten B-Zellen

nRNA - nukleärer Ribonukleinsäurestränge

NRF-1 - nukleärer Atmungsfaktor 1

NRF-2 – nukleärer Atmungsfaktor 2

OXPHOS – oxidative Phosphorylierung

PGC-1alpha - Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor Gamma Koaktivator

PFK1 – Phosphofruktokinase 1

PK - Pyruvatkinase

PET-CT - Positronen-Emissions-Tomographie

rRNA – ribosomale Ribonukleinsäurestränge

STAT – Signaltransducer und Aktivatoren der Transkription

TFAM - mitochondrialer Transkriptionsfaktor A

tRNA – Transfer-Ribonukleinsäurestränge

UPR^{mt} - unfolded protein response – Signalantwort auf ungefaltete Proteine

1. Zusammenfassung

Funktionierende Mitochondrien sind über den Citratzyklus und die Atmungskette sowohl für den Stoffwechsel als auch für die Energiegewinnung von Tumorzellen von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass zwei etablierte Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) aufwiesen und dadurch eine reduzierte basale Aktivität der Atmungskettenkomplexe zeigten. Diese mtDNA-Mutationen führten jedoch nicht zu einem bioenergetischen Defekt, sondern lösten eine retrograde Signalreaktion aus, welche die mitochondriale Biogenese anregte, die mitochondriale Masse erhöhte und mit einer gesteigerten anabolen Funktion der vorhandenen Mitochondrien einherging. Folgerichtig wurde die Proliferation von cHL Zellen *in vitro* sowie das Lymphomwachstum in Mäusen *in vivo* gefördert. Wurde die Assemblierung von Komplex I der Atmungskette durch Ausschaltung einer seiner Untereinheiten gestört, kam es zu einer weiteren Zunahme der mitochondrialen Masse und Steigerung der mitochondrialen Funktion und folglich zu einer weiteren Beschleunigung des Tumorwachstums *in vivo*. Im Gegensatz dazu wurde durch den mitochondrialen Komplex-I-Inhibitor Metformin in Mäusen die mitochondriale Atmung *in vivo* gehemmt und das Tumorwachstum langsamer.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass moderat schädliche mtDNA-Mutationen in cHL-Krebszellen zu einer Zunahme der mitochondrialen Masse als kompensatorischer Effekt über einen retrograden Signalweg führen. Dieser führt über die dadurch verbesserte anabole Funktion zu einem gesteigerten Tumorwachstum.

2. Einleitung

2.1. HODGKIN LYMPHOM

Das Hodgkin Lymphom (HL) ist eine Tumorerkrankung, welche sich häufig in den peripheren Lymphknoten manifestiert. Sie kann aber auch andere Organe wie die Leber, die Lunge und das Knochenmark betreffen.¹ Benannt ist die Krankheit nach Thomas Hodgkin, der die Erkrankung im Jahr 1832 zuerst beschrieb.²

2.1.1. Epidemiologie

Das HL ist eines der häufigsten Lymphome in der westlichen Welt mit einer jährlichen Inzidenzrate von etwa 3 Neuerkrankungen im Jahr/100.000 Personen in Deutschland, womit es insgesamt trotzdem eine seltene Erkrankung ist.¹ Im Jahr 2020 wurden weltweit etwa 83.000 neue Fälle erfasst, was einer weltweiten Inzidenz von etwa 1/100.000 entspricht. Hierbei zeigen sich deutliche regionale Unterschiede mit den höchsten Inzidenzen in Südeuropa, Nordeuropa, Australien und Neuseeland sowie Westeuropa. Die niedrigsten Inzidenzen zeigen sich in Ostasien, Südostasien, Mittelfrika und Melanesien. Insgesamt tritt das HL bei Männern doppelt so häufig auf wie bei Frauen.³ Bei Jugendlichen zwischen 15 und 19 Jahren zählt das HL zu den häufigsten Tumorerkrankungen.⁴

2.1.2. Histologische Einteilung

Die Einteilung des HL erfolgt historisch histopathologisch. Hierbei werden das sogenannte klassische HL, welches die Entitäten (I) nodulär-sklerosierender Typ, (II) Mischtyp, (III) lymphozytenreiches HL und (IV) lymphozytenarmes, klassisches HL umfasst und das noduläre lymphozytenprädominante HL (NLPHL) unterschieden.¹ Etwa 90% des cHL werden durch die beiden Subtypen nodulär sklerosierend (ca. 60%) und Mischtyp ausgemacht (ca. 30%). Das NLPHL sorgt insgesamt nur für etwa 5% der Fälle des HL.⁵

Für die klinische Behandlung spielt die histopathologische Einteilung heutzutage keine Rolle mehr. Für die vorliegende Arbeit ist es aber wichtig zu erwähnen, dass im cHL die charakteristischen Tumorzellen als Hodgkin und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) bezeichnet werden.⁵ Die Bezeichnung dieser Zellen stammt aus dem Jahr 1902, in welchem diese Zellen das erste Mal von Dorothy Reed und Carl Sternberg beschrieben wurden.⁵

HRS-Zellen sind im cHL nicht die vorherrschende Zellpopulation, sie machen in der Regel nur zwischen 1 und 10% der vorhandenen Zellen aus. Der Großteil der Zellen des cHL sind gemischt immunzelluläre Infiltrate.⁵ Der folgende Teil konzentriert sich auf die HRS Zellen des cHL.

2.1.3. Biologie des klassischen Hodgkin Lymphoms

Die HRS-Zellen des cHL stammen wahrscheinlich von B-Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien aus dem Keimzentrum ab, welche im Laufe ihrer Entwicklung nachteilige

Mutationen an der variablen Kette der Immunglobuline erworben haben.⁶ Durch eine nicht vollständig verstandene Neuprogrammierung der Genexpression werden mehrere Signalwege und Transkriptionsfaktoren in HRS Zellen des cHL im Laufe ihrer Entwicklung so dysreguliert, dass die HRS Zellen der Apoptose entkommen können.⁷ Interessanterweise zeigen sich in HRS Zellen kaum noch typische B-Zell Gene, dagegen tragen sie viele genetische Eigenschaften von anderen Zellen des Immunsystems.⁸ Die genaue biologische Aufschlüsselung der Mechanismen, welche zur Veränderung der HRS Zellen führen, ist bisher nicht gelungen. Es gibt aber einige Signalwege, bei denen eine Beteiligung für sehr wahrscheinlich gehalten wird. Hierzu zählen unter anderem der NF-kappa-B-Signalweg⁹ und die JAK-STAT-Signalkaskade.¹⁰ Wie bereits beschrieben, bestehen Lymphknoteninfiltrate aber nicht führend aus HRS-Zellen, sondern es besteht eine entzündliche Mikroumgebung. Dieses Milieu begünstigt das Überleben von HRS-Zellen ebenso und trägt dazu bei, dem Angriff natürlicher Killerzellen oder zytotoxischer T-Zellen über verschiedene Signalwege zu entgehen.^{11–13}

2.1.4. Klinik und Therapie

Klinisch macht sich das cHL insbesondere durch eine sogenannte B-Symptomatik bemerkbar. Hierzu gehören Fieber, Nachtschweiß und ungewollter Gewichtsverlust. Oft bemerken die Patient:innen auch Lymphknotenschwellungen, insbesondere zervikal oder axillär. Die klinische Einteilung erfolgt nach der sogenannten Ann-Arbor-Klassifikation in verschiedene Riskogruppen (frühe Stadien, mittlere Stadien und fortgeschrittene Stadien), welche sich aus der Ausbreitung des Lymphknoten- bzw. Organbefalles und dem Vorhandensein einer B-Symptomatik ergibt. Hinzukommen festgelegte Risikofaktoren der Deutschen Hodgkin Studiengruppe (GHSG), welche die Einteilung in Risikogruppen mit beeinflussen.¹⁴ Die Erstlinientherapie besteht in der Regel aus einer Polychemotherapie, es gibt aber auch neuere Therapieansätze mit monoklonalen Checkpoint-Inhibitoren wie Nivolumab und Pembrolizumab.^{15,16}

Insgesamt besteht beim Hodgkin-Lymphom eine Heilungsrate von 80-90%.¹⁷

2.2. MITOCHONDRIEN UND ENERGIEHAUSHALT

2.2.1. Glykolyse

In gesunden menschlichen Zellen findet anaerobe Glykolyse klassischerweise nur dann statt, wenn kein ausreichendes Angebot an Sauerstoff zur Verfügung steht, z.B. in der Muskulatur bei rascher Aktivierung. Glukose wird über den Glukose-1-Transporter (GLUT-1) in die Zelle transportiert. Dabei werden durch den Abbau eines Moleküls Glukose zu zwei Laktat-Molekülen netto zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP) generiert.¹⁸ Abbildung 1 zeigt den Mechanismus:

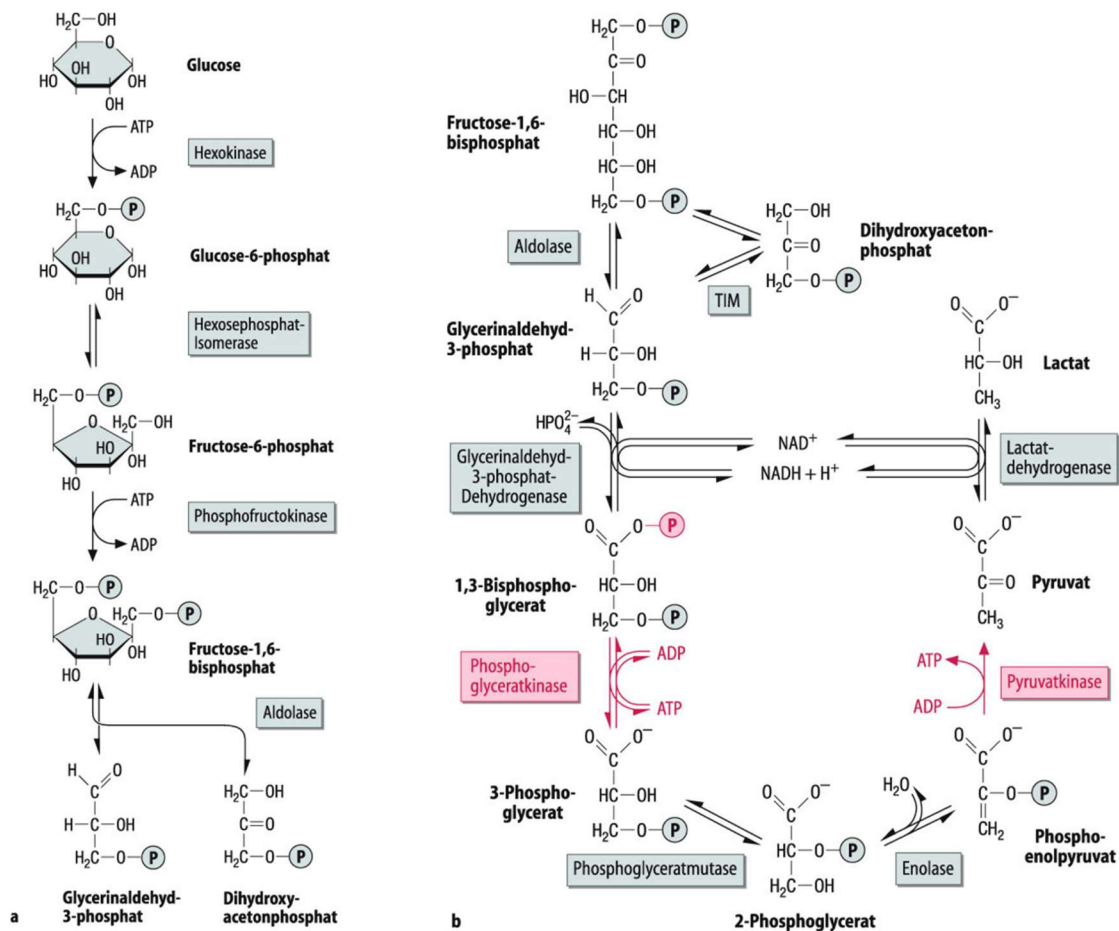


Abbildung 1: Darstellung der Glykolyse: Intrazelluläre Spaltung von Glukose über Fruktose und Pyruvat zu Laktat, hierbei entstehen 2 Moleküle ATP. Die Abbildung stammt aus Löffler/Petrides/Heinrich: Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage 2007, Springer Verlag.

2.2.2. Die mitochondrialen Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) dient der Energiegewinnung in Mitochondrien durch die Atmungskette. Über die Mitochondrien erfolgt in gesunden Zellen der Großteil der Energiegewinnung. Bei der Oxidation von Nährstoffen wie Fettsäuren und Glukose werden Elektronen auf die Redox-Coenzyme Nicotinamadenindinukleotid (NAD) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) übertragen. Diese werden durch Elektronenübertragung durch die Atmungskettenkomplexe I bis IV genutzt, um einen Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran zu erzeugen. Am Komplex V (oder auch ATP-Synthase) wird dieser Gradient genutzt um Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) zu phosphorylieren. Bereits minimale Veränderungen der Atmungskettenaktivität führen zu Erkrankungen.¹⁹

Komplex I ist der größte Komplex der Atmungskette. Er besteht aus 14 Kernuntereinheiten und 31 weiteren Untereinheiten.²⁰ Dabei werden die sieben intramembranösen

Kernuntereinheiten NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase-Ketten-Protein 1-6 (ND1-ND6) und NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase-Ketten-Protein-4L (ND4L) im mitochondrialen Genom kodiert.^{21,22} Die Kernuntereinheiten sind sowohl in der Matrix als auch in der Membran von einem Netz von weiteren Untereinheiten umgeben, die für den Zusammenbau und die Stabilität des Komplexes essentiell sind.²³ Funktionell werden am Komplex I durch die Reduktion von NADH zu NAD⁺ vier Protonen durch die innere Mitochondrienmembran befördert, die zum Aufbau des Elektronengradienten beitragen.

Komplex II ist das Bindeglied zwischen dem Krebszyklus und dem OXPHOS System.²⁴ Dieser Komplex verbindet die Oxidation von Succinat zu Fumarat mit der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol. Ubichinol wiederum wird als Substrat in Komplex III eingeschleust. Komplex II besteht aus vier Untereinheiten, die alle im Zellkern kodiert werden.²⁴

Komplex III koppelt die Oxidation von Ubichinol aus Komplex II an die Reduktion des wasserlöslichen Elektronenüberträgers Cytochrom C. Hierbei werden zwei Elektronen aus der Matrix aufgenommen und vier in den intermembranösen Spalt abgegeben. Komplex III hat eine homodimere Struktur mit je drei katalytischen Untereinheiten pro Monomer. Nur eine katalytische Untereinheit wird von der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert (Cytochrom B).²⁵ Zusätzlich zu den katalytischen Untereinheiten gibt es in Komplex III 8 weitere Untereinheiten.

Komplex IV nimmt die von Cytochrom C gelieferten Elektronen auf, um Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren, und überträgt zusätzlich für jedes Cytochrom C-Molekül ein Proton in den intermembranösen Spalt.²⁶ In den meisten Kristallstrukturen von isoliertem Komplex IV erscheint dieser als Dimer. Jedes Komplex-IV-Monomer enthält 13 Untereinheiten, von denen die drei in die Membran eingebetteten Kernuntereinheiten von der mtDNA kodiert sind (Cytochrom C Oxidase (COX)), während die anderen im Kerngenom kodiert werden.²⁷

Komplex V synthetisiert schließlich ATP. Er besteht aus zwei Teilen: einem F1-Teil, der in die Matrix des Mitochondriums hinein ragt und einen F0-Teil, der einen Protonenkanal durch die innere Mitochondrienmembran bildet. Zwei Untereinheiten der ATP-Synthase sind mtDNA kodiert.²⁸

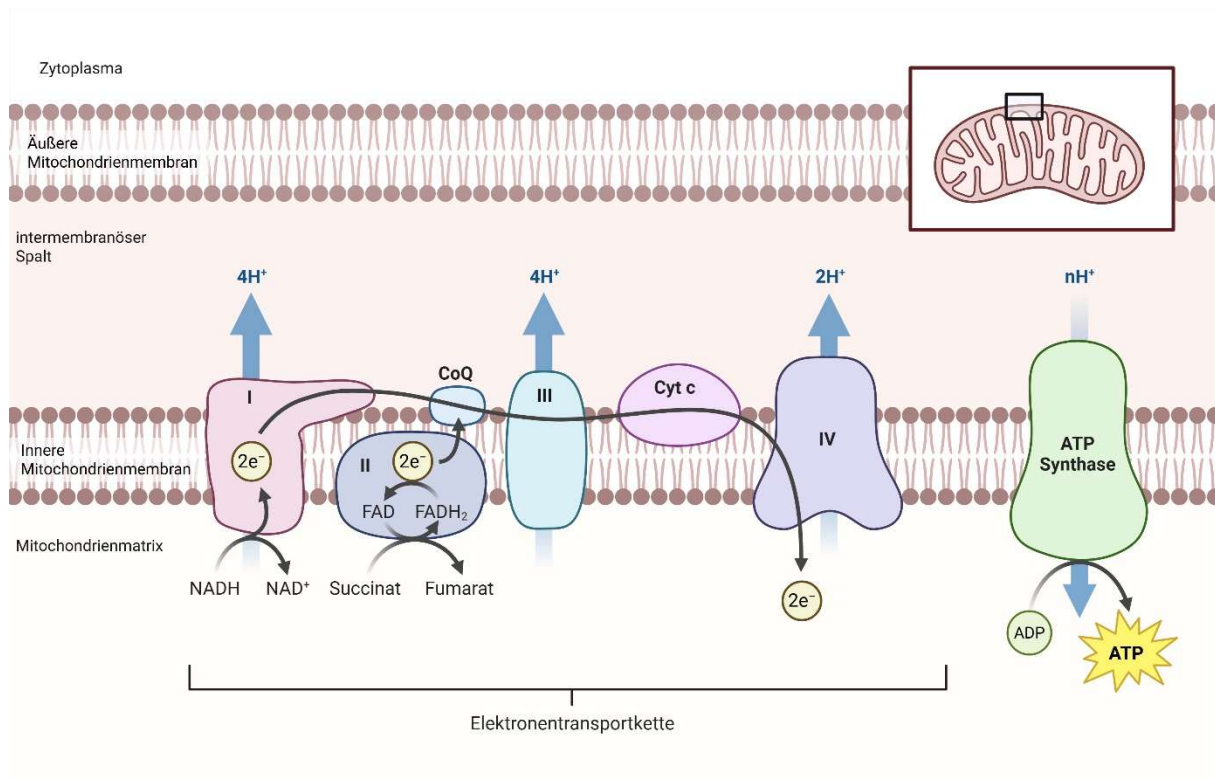


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Elektronenflusses über die Atmungskettenkomplexe I-V, wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.2.3. Genetik der Mitochondrien

Die mtDNA ist ringförmig und umfasst knapp 17000 Basenpaare (BP). Sie enthält 37 Gene, hiervon kodieren 13 für Proteine der Atmungskettenkomplexe, 22 für transfer-RNAs (tRNAs) und zwei für ribosomale RNAs (rRNAs). mtDNA wird ausschließlich maternal vererbt, da die Eizelle viele Mitochondrien enthält und Spermien-Mitochondrien, die in die Zygote gelangen, dort abgebaut werden. Alle anderen Proteine der Atmungskette und der Mitochondrien im allgemeinen sind im Zellkern kodiert und werden importiert.²⁹ Obwohl nur eine kleine Anzahl der Atmungskettenproteine auf der mtDNA kodiert sind, sind diese essentiell, denn ohne diese ist die OXPHOS nicht funktionsfähig.³⁰ MtDNA enthält keine Introns, und es gibt nur eine längere, nicht kodierende Region, die als Kontrollregion bezeichnet wird. Die Kontrollregion enthält einen eigenen Promotor für die Transkription jedes Strangs der mtDNA, d. h. den Promotor des leichten Strangs (LSP) und den Promotor des schweren Strangs (HSP), sowie regulatorische Sequenzen, die die mtDNA-Replikation und Transkription steuern.²⁹ In jeder Zelle liegen die Kopien der mtDNA im Bereich von 1000 bis 100.000 vor.³¹ Die Transkription und Translation mitochondrialer Proteine ist ein streng überwachter und komplex regulierter Prozess.³² Die Transkription der mtDNA wird bidirektional von den eng beieinander liegenden Promotoren (HSP und LSP) innerhalb der D-Schleife ausgelöst. Für die Transkription werden

die mitochondriale RNA-Polymerase und das Strukturprotein mitochondrialer Transkriptionsfaktor A (TFAM) benötigt, einem DNA-bindenden Stimulationsfaktor, der für die Erhaltung der mtDNA und Verpackung der mtDNA erforderlich ist.^{33,34} Ebenso sind an der Transkription mitochondriale Transkriptionsspezifitätsfaktoren (TFB1M und TFB2M) beteiligt, welche im Zellkern wiederum von den Transkriptionsfaktoren nukleären Atmungsfaktoren (NRF-1 und NRF-2) gesteuert werden. Als wichtigster Koaktivator wird unter anderem Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor Gamma Koaktivator (PGC-1alpha) postuliert.³⁴ PGC-1 stimuliert eine starke Induktion der NRF-1 und NRF-2-Genexpression; darüber hinaus bindet PGC-1alpha an den Promotor für TFAM und koaktiviert so die Transkriptionsfunktion von TFAM an der mtDNA.³⁵ Die Replikation der mtDNA erfolgt über die DNA Polymerase gamma.²⁹

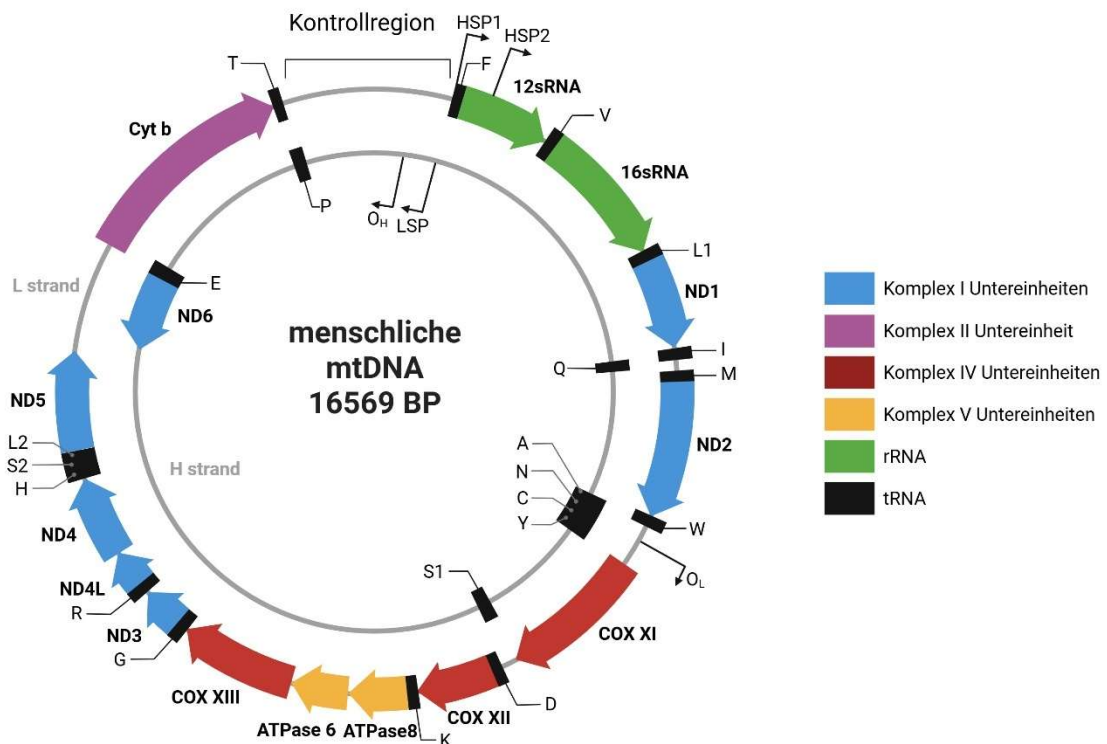


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur der mitochondrialen DNA.

Die mtDNA liegt ringförmig vor. Auf ihr werden 13 Proteine für die Atmungskettenkomplexe I und II-IV kodiert, ebenso zwei rRNAs und 22 tRNAs. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.3. MITOCHONDRIEN IN TUMORERKRANKUNGEN

2.3.1. Der Warburg Effekt und metabolische Alterationen in Tumorzellen

Ein veränderter Energiestoffwechsel in Tumorzellen, wie beispielsweise den HRS-Zellen, ist schon seit langer Zeit bekannt. In den letzten Jahrzehnten ist dieser Mechanismus wieder vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt.³⁶

Bereits in den 1920er Jahren veröffentlichte Otto Warburg seine Beobachtung, dass Tumorzellen trotz der Anwesenheit von Sauerstoff große Mengen Glukose in Laktat umwandeln. Diese aerobe Glykolyse wurde als Warburg-Effekt bekannt.³⁷ Es schien Warburg auf den ersten Blick wie eine Verschwendung von reduziertem Kohlenstoff für die Synthese von Zellbausteinen, wobei dieser reduzierte Kohlenstoff eigentlich für die Produktion von ATP verwendet werden könnte. Warburg postulierte sogar, dass der auslösende Faktor für die Krebsentstehung eine Störung des OXPHOS sein könne, deren Folge eine verstärkte Glykolyse ist.³⁸ Inzwischen geht man davon aus, dass die aerobe Glykolyse nicht die Folge von Störungen der OXPHOS ist, sondern viel mehr dazu dient, Teile des Glukosekohlenstoffes gemeinsam mit Glutamin zur schnellen Generierung von Biomasse zu verwenden und damit eine schnelle Zellteilung bei ausgeglichenem Redox-Gleichgewicht zu ermöglichen.³⁹

Trotz der enormen Fortschritte, welche bei der Aufklärung der Mechanismen für diese metabolische Umprogrammierung gemacht wurden, ist die Rolle der mitochondrialen Dysfunktion bei der Krebsprogression nach wie vor nicht vollständig verstanden und Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion.

Die derzeitige Kontroverse geht zurück auf unterschiedliche Ansichten über den Aufbau und die Funktionalität von Mitochondrien in Krebszellen, begründet durch unterschiedliche und scheinbar kontroverse grundlagenwissenschaftliche Befunde. Zahlreiche Studien zeigen beispielsweise eine verminderte Expression mitochondrialer Enzyme bei verschiedenen Krebsarten und sprechen sich für eine Störung der OXPHOS in Tumorzellen aus.^{40–42} In einer anderen Studien konnten in Endometriumkarzinomen gesteigerte Expressionsniveaus von TFAM, NRF-1 und PGC-1alpha gezeigt werden, welche alle als Schlüsselfaktoren der mitochondrialen Biogenese fungieren.⁴³ PGC-1alpha unterstützt die mitochondriale Biogenese in einigen Tumorzellen und unterstützt damit über eine gesteigerte OXPHOS das Tumorwachstum und die schnellere Metastasierung.⁴⁴ Damit übereinstimmend konnte in Brustkrebszellen eine höhere Aktivität der Cytochrom C Oxidase (COX) und erhöhte Level des mitochondrialen Markerproteins TOMM20 nachgewiesen werden. Diese waren insbesondere in der am raschesten wachsenden Subpopulation des heterogenen Brustkrebsgewebes nachweisbar, was beweist, dass einige Tumorzellen auf jeden Fall intensiv die OXPHOS zum Wachstum nutzen.⁴⁵ In Tumorzellen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereich wurde gezeigt, dass die vermehrte Glucose-Aufnahme in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET-CT) als negativer prognostischer Marker zu

verwenden ist. Genau in diesen Tumoren mit hoher Glukoseaufnahme zeigten sich aber interessanterweise auch vermehrte Mengen ATP-Synthase ohne Steigerung anderer Atmungskettenproteine.⁴⁶

2.3.2. Mitochondriale DNA Mutationen in Tumorerkrankungen

Mutationen in der mtDNA sind ein häufig diskutierter Faktor bei der Entwicklung von Tumorzellen. 2006 wurde das erste Mal eine Metaanalyse durchgeführt, welche die verschiedenen beschriebenen mtDNA-Sequenzvarianten bei verschiedenen Krebserkrankungen betrachtete. Überraschenderweise ergab diese Metaanalyse, dass ein signifikanter Anteil der bei Krebs gemeldeten mtDNA-Varianten mit denen übereinstimmte, die in verschiedenen menschlichen Populationen als Polymorphismen beobachtet wurden. Dieses Erkenntnis führte zu der Hypothese, dass es zwei Klassen von mtDNA-Mutationen bei Krebs geben könnte: schwere Mutationen, die zur Krebsentstehung nicht beitragen, und mildere Mutationen, die für die Anpassung der Krebszellen wichtig sind.³¹

Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass sich in zahlreichen Studien mtDNA-Mutationen bei einer Vielzahl von Krebsarten wie Schilddrüsen-, Prostata-, Eierstock- Lungen- und Brustkrebs sowie bei Lymphomen nachweisen ließen⁴⁷, während in anderen großen Studien gezeigt werden konnte, dass schwerwiegende mtDNA Mutationen, welche beispielsweise zu fehlerhafter oder fehlender Proteinsynthese führen, in Tumorerkrankungen nicht so häufig auftreten.^{48,49} Ebenso konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen ohne mtDNA ein langsames Wachstum aufweisen und mtDNA aus der Mikroumgebung aufnehmen um ihre Atmungskettenfunktion zu verbessern und somit ein schnelleres Wachstum zu ermöglichen.⁵⁰

Andere Arbeiten konnten dagegen zeigen, dass die vermuteten Zusammenhänge zwischen mtDNA Mutationen und Krebsentstehung, beispielsweise bei der Entstehung von Brustkrebs, nicht sicher nachvollziehbar sind.⁵¹

Insgesamt bleibt also der Einfluss von mtDNA Mutationen auf die Funktionalität der Mitochondrien in der Tumorentstehung trotz tiefgreifender Forschungsarbeiten nicht klar beantwortet und muss für verschiedene Tumorentitäten sehr differenziert betrachtet werden.

2.4. FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT

cHL sind insgesamt selten, aber einer der häufigsten Tumore bei Jugendlichen. Insbesondere in dieser Patientengruppe sollten Therapien so wenig toxisch wie möglich sein. Daher ist eine Erforschung therapeutischer Alternativen zur Polychemotherapie von potentiell großem klinischen Nutzen. cHL sind gekennzeichnet durch pathognomonische HRS-Zellen, welche einige funktionalen Besonderheiten aufweisen. Der Einfluss von mtDNA Mutationen auf die Funktionalität der Mitochondrien in der Tumorentstehung, insbesondere auch in der Entstehung von cHL ist nicht abschließend verstanden. Diese Arbeit hat zum Ziel, zu

untersuchen, inwiefern mtDNA Mutationen eine Rolle im Metabolismus der HRS-Zellen und damit in der Pathogenese des cHL spielen. 2016 wurde bereits publiziert, dass HRS-Zellen ihre OXPHOS zum Wachstum zwingend benötigen und eine erhöhte mitochondriale Biogenese aufweisen.⁵² Diese Befunde sollten mit den durchgeführten Experimenten bestätigt werden und darüber hinaus die Frage beantworten, welche Rolle mtDNA Mutationen bei dieser Beobachtung spielen. Um insbesondere auch die funktionellen Auswirkungen von mtDNA Mutationen untersuchen zu können, stellten wir den Anspruch, *in vivo* Experimente im Tiermodell durchzuführen und das Tumorwachstum in Gegenwart unterschiedlicher Mutationen und unter verschiedenen Behandlungen *in vitro* zu beurteilen.

3. Manuskript der Publikation

OXFORD

Carcinogenesis, 2020, Vol. 41, No. 12, 1735–1745

doi:10.1093/carcin/bgaa032

Advance Access publication April 7, 2020

Original Article

ORIGINAL ARTICLE

Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial biogenesis and increase the tumorigenic potential of Hodgkin and Reed–Sternberg cells

Sophie Haumann^{1,2,†}, Julia Boix^{1,†}, Jana Knuever^{1,3}, Angela Bieling¹, Anton Vila Sanjurjo⁴, Joanna L. Elson^{5,6}, Emma L. Blakely⁷, Robert W. Taylor⁷, Nicole Riet⁸, Hinrich Abken^{8,9,10}, Hamid Kashkar^{9,11,12}, Hue-Tran Hornig-Do¹ and Rudolf J. Wiesner^{1,9,12,*}

¹Center for Physiology and Pathophysiology, Institute of Vegetative Physiology, Medical Faculty, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany, ²Department of Pediatrics, Medical Faculty and University Hospital of Cologne, 50931 Cologne, Germany, ³Department of Dermatology, Medical Faculty and University Hospital of Cologne, 50931 Cologne, Germany, ⁴Grupo GIBE, Departamento de Biología Celular e Molecular, Facultad de Ciencias, Universidade de A Coruña (UDC), Campus Zapateira, s/n 15.071, A Coruña, Spain, ⁵Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE13BZ, UK, ⁶Human Metabolomics, North-West University, Potchefstroom 2531, South Africa, ⁷Wellcome Centre for Mitochondrial Research, Institute of Neuroscience, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK, ⁸Department I for Internal Medicine, Medical Faculty and University of Cologne, 50931 Cologne, Germany, ⁹Center for Molecular Medicine Cologne, 50931 Cologne (CMC), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany, ¹⁰RCI, Regensburg Center for Interventional Immunology, Chair Gene-Immunotherapy, University Hospital Regensburg, 93053 Regensburg, Germany, ¹¹Institute of Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Medical Faculty and University Hospital of Cologne, 50931 Cologne, Germany and ¹²Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

*To whom correspondence should be addressed. Center for Physiology and Pathophysiology, Institute of Vegetative Physiology, Robert-Koch-Str. 39, 50931 Cologne, Germany. Tel: +49 221 4786950; Fax: +49 221 4783538; Email: rudolf.wiesner@uni-koeln.de

†Sophie Haumann and Julia Boix should both be considered as first author.

Abstract

Functioning mitochondria are crucial for cancer metabolism, but aerobic glycolysis is still considered to be an important pathway for energy production in many tumor cells. Here we show that two well established, classic Hodgkin lymphoma (cHL) cell lines harbor deleterious variants within mitochondrial DNA (mtDNA) and thus exhibit reduced steady-state levels of respiratory chain complexes. However, instead of resulting in the expected bioenergetic defect, these mtDNA variants evoke a retrograde signaling response that induces mitochondrial biogenesis and ultimately results in increased mitochondrial mass as well as function and enhances proliferation *in vitro* as well as tumor growth in mice *in vivo*. When complex I assembly was impaired by knockdown of one of its subunits, this led to further increased mitochondrial mass and function and, consequently, further accelerated tumor growth *in vivo*. In contrast, inhibition of mitochondrial respiration *in vivo* by the mitochondrial complex I inhibitor metformin efficiently slowed down growth. We conclude that, as a new mechanism, mildly deleterious mtDNA variants in cHL cancer cells cause an increase of mitochondrial mass and enhanced function as a compensatory effect using a retrograde signaling pathway, which provides an obvious advantage for tumor growth.

Received: September 6, 2019; Revised: March 17, 2020; Accepted: April 6, 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

1735

Abbreviations

BFP	blue fluorescent protein
cHL	classic Hodgkin lymphoma
mtDNA	mitochondrial DNA
NAO	nonyl acridine orange
nDNA	nuclear DNA
NRF-1	nuclear respiratory factor 1
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
RC	respiratory chain

Introduction

An emerging hallmark of cancer cells is a reprogrammed energy metabolism which is adapted to rapid proliferation (1). This is partially achieved by converting large amounts of glucose to lactate, despite the presence of oxygen, the well-known Warburg effect (2,3). This seems to be at first glance a waste of reduced carbon which could be used for adenosine triphosphate (ATP) production, but is obviously necessary for the synthesis of cellular building blocks. Warburg even postulated that the initiating factor for cancer formation is an 'injury' to the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), which results in enhanced glycolysis (4). However, it is now widely accepted that aerobic glycolysis enables tumor cells to divert part of the glucose carbon, together with glutamine, from mitochondrial ATP production to biomass accumulation and consequently rapid cell division, while maintaining an appropriate redox balance. Despite the enormous progress made in elucidating the mechanisms for this metabolic reprogramming, the role of mitochondrial dysfunction in cancer progression still remains a contentious issue (5).

Besides their classic roles, namely ATP generation, calcium handling and apoptosis, it recently became clear that mitochondria also play an essential role in anabolic pathways and act as important signaling hubs critical for normal cell function (5). The organelles are under dual genetic control—the 16.6-kb mitochondrial genome (mtDNA) and the nuclear genome, which together encode for approximately 1200 proteins of the mitoproteome. mtDNA encodes two rRNAs, 22 tRNAs and 13 of about 100 proteins of the mitochondrial respiratory chain (RC) (6).

The current controversy stems from different views on the content and functionality of mitochondria in cancer cells, strongly supported by different and seemingly controversial findings. There are numerous studies showing decreased expression of mitochondrial enzymes in different cancer types (7–9). Warburg's original hypothesis is supported by a large body of observations pointing to the presence of mtDNA mutations in a wide variety of cancer types like thyroid, prostate, ovarian, lung and breast cancer as well as lymphomas (6). However, conclusive evidence for a causal link between such mtDNA variants and cancer metabolism or initiation is still lacking.

Moreover, two recent large-scale studies examining the mutational landscape of the mitochondrial genome in over 2000 human cancers across more than 30 tumor types suggested that there is strong selective pressure against severely deleterious mtDNA alterations, like mutations resulting in protein truncation, emphasizing that functional mitochondria are indeed required in tumor cells (10,11). However, others consider variants of mtDNA either to be random or, in stark contrast, even drivers of pathogenicity (12). Higher expression levels of mitochondrial transcription factor A, nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), key factors in the pathway regulating mitochondrial biogenesis, have been observed in endometrial cancer tissue, suggesting an upregulation of mitochondrial biogenesis in some cancer

cells (13). In agreement, high cytochrome c oxidase (COX) activities measured *in situ* and elevated levels of the mitochondrial marker protein TOMM20 have been shown in the most rapidly proliferating subset of cells of the heterogeneous breast cancer tissue, again confirming the existence of cancer cell types with high OXPHOS levels (14). We have shown previously that high glucose uptake (fluorodeoxyglucose positron emission tomography) correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma, as expected, but surprisingly it was accompanied by high levels of the ATP-synthase, but not of other mitochondrial proteins (15). Additionally, it has been demonstrated that PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis with increased OXPHOS in some cancer cells to promote tumor growth and metastasis, while the loss of PGC-1 α as well as mtDNA protects against formation of several tumor entities *in vivo* (16,17). Increased mitochondrial biogenesis can thus lead to diverse metabolic alterations in tumor cells depending on the cell and tumor type.

In this study, we examine the presence of pathogenic mtDNA mutations in classic Hodgkin and Reed-Sternberg lymphoma (cHL) cell lines, in which increased mitochondrial biogenesis was previously reported (18). We show that both cHL cell lines harbor deleterious mtDNA variants, which result in decreased levels of RC complexes and assembled supercomplexes. However, this does not lead to a bioenergetic defect, as expected, since it evokes a retrograde signaling response as a compensatory effect, ultimately resulting in increased mitochondrial mass and function which is advantageous for tumor growth.

Materials and methods

Cell lines and cell culture

Hodgkin lymphoma derived cell lines L428 (RRID: CVCL_1361) and L1236 (RRID: CVCL_2096) were used (DSMZ, Braunschweig, Germany). Authentication showed that all experiments were performed with mycoplasma-free cells. Three Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines from healthy donors were used as controls. Cells were fed every 2–3 days with GIBCO® RPMI Medium 1640 plus GlutaMAX™ (Life Technologies, Darmstadt, Germany), supplemented with 10% calf serum and 1% penicillin-streptomycin, at 37°C and 5% CO₂. When indicated, cells were grown in medium without glucose, but 4.5 g/l galactose, or 2-deoxyglucose instead, to either decrease flux or completely inhibit glycolysis, respectively.

Generation of L428 NDUFV2KD and L428 NDI1 cells

For genome-editing, a gRNA targeting the NDUFV2 gene (5'-ATGTATAA TCGAAAGCCAGT-3') was cloned into the BsmBI site of lentiCRISPR v2 vector (Addgene plasmid #52961; Cambridge, MA). LentiCRISPR v2 containing gRNA and packaging plasmids pMD2.G and psPAX2 (Addgene plasmid #12259 and #12260) were transfected into HEK-293FT cells with lipofectamin 2000 and OPTI-MEM media (Life Technologies, Darmstadt, Germany) to produce the lentiCRISPR-NDUFV2 gRNA lentivirus. NDI1 vector containing blue fluorescent protein (BFP) was equally transfected into HEK-293FT cells along with pMD2.G and psPAX2 packaging vectors to produce NDI-BFP lentivirus. Lentivirus were harvested twice at days 4 and 5, filtered through 0.35 μ m filters and concentrated using LentiX concentrator (Clontech, Mountain View, CA). Lentiviral infection of L428 cells was performed with 8 μ g/ml polybrene (Sigma, Darmstadt, Germany). Cells were selected with 2 μ g/ml puromycin 3 days after infection. For lentiviral CRISPR knockdown, cells were selected for 14 days and maintained in culture media containing 1 μ g/ml puromycin. Selection of NDI1-BFP expressing cells was done by fluorescence-activated cell sorting for BFP-positive cells with a FACS ARIA (BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ).

In silico predictions

In order to determine possible pathogenicity of rRNA mutations, heterologous inferential analysis studies were performed (19,20). Alamut Visual 2.10 (interactive biosoftware) was used for missense variant pathogenicity prediction, collating SIFT, PolyPhen-2 and Align GVGD predictions

alongside nucleotide and amino acid conservation data (21–23). Frequency data for mitochondrial variants were obtained from MITOMAP: Human Mitochondrial Genome Database, <http://www.mitomap.org>, 2018. MutPred software was also used to predict pathogenicity of non-synonymous variants. This software gives pathogenicity scores ranging from 0 to 1, higher scores indicate a greater likelihood of a deleterious or pathogenic variant. The MITOMAP database was used to gather information on the mtDNA variants of interest (24).

Doubling time and measurement of lactate production

Cells were seeded at equal density of 5000 cells/cm², cultivated with daily changes of medium for 4 days, harvested every 24 h and counted (CASY TT, Omni Life Science, Bremen, Germany). Doubling times were determined using the average of three 24 h intervals. Media were collected before counting and lactate concentration was determined (EML 105, Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Measurements of oxygen consumption and enzyme activities

Oxygen consumption of intact cells was measured using Clark oxygen electrodes (Hansatech, King's Lynn, UK). Spectrophotometric measurements of enzymatic activities were performed as described (25) (Varian Spectroscopy Instruments, Palo Alto, CA).

Immunoblotting and assessment of OXPHOS complex assembly

Whole-cell extracts were prepared in lysis buffer containing 1% (wt/vol) [(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]1-propanesulfonate, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid pH 7.4, 150 mM NaCl and complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Mannheim, Germany). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (Sigma, Darmstadt, Germany) and incubated with primary antibodies (Supplementary Table 1, available at [Carcinogenesis Online](http://carcinogenesisonline.org)). Immunoreactive complexes were detected with secondary peroxidase-labeled antibodies and enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Mitochondria from cell pellets were isolated by superparamagnetic microbeads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) and large RC complexes were analyzed as described (25).

Flow cytometry

The cardiolipin binding dye nonyl acridine orange (NAO, Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, Germany) was used to estimate mitochondrial inner membrane mass. 1×10^6 cells/ml were incubated with 40 nM NAO for 20 min at 37°C and washed with phosphate-buffered saline before analysis.

mRNA levels

RNA isolation was performed using PureLinkSystem (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and complementary DNA was synthesized with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). 5 ng complementary DNA was used as template (TaqMan Gene Expression Master Mix) and RealTime PCR was carried out (7500 Fast Real Time PCR System; both ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany).

mtDNA deletions and copy number

Total DNA was extracted from cells using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Cells were screened for deletions using a nested PCR approach and mtDNA copy number was determined as described previously (26).

mtDNA sequencing

The entire mitochondrial genome was sequenced (Ion Torrent PGM) following amplification to generate two overlapping amplicons; data were aligned to the revised Cambridge reference sequence for human mtDNA (GenBank Accession number: NC_012920.1) with a minimum read depth of $\times 200$. Analytical sensitivity for single nucleotide variants present at $\geq 5\%$ heteroplasmy was $\geq 95\%$ (95% confidence interval).

Tumor growth in mice

cHL tumors were induced subcutaneously injecting 5×10^6 cells into NSG mice. Seven days postinjection mice were given water supplemented with metformin (1.25 mg/ml; Sigma, Darmstadt, Germany) to ensure an effective dose of metformin of 250 mg/kg/day (27). In mice receiving drinking water containing 1–5 mg/ml of metformin, the plasma steady-state metformin concentration was reported to be in the range of 0.45–1.7 $\mu\text{g/ml}$, similar to that in patients receiving metformin therapy. Tumors were measured twice per week. In case of large tumor size (>0.8 cm) or massive weight loss ($>15\%$), mice were killed. Experiments were performed in accordance with the local animal experimentation guidelines and approved by the regional council.

Statistics

Results are given as means $\pm$ SD. Results were compared using Student's t-test, assuming equal variances. Significance levels of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Data availability

All data will be made available upon reasonable request.

Results

Lymphoma cells use aerobic glycolysis for proliferation and harbor variants in mitochondrial genes

Both cHL B-cell lines showed a shorter doubling time compared with Epstein-Barr virus-transformed, immortalized B-cell lines, which we decided to use as appropriate controls (Figure 1A). Increased proliferation rate of cHL cells was associated with elevated lactate production (Figure 1B); however, there was no simple relation between these two parameters, because the L1236 cell line produced more lactate, but grew slower than L428 cells.

To analyze potential 'injuries to the OXPHOS system' driving the increased lactate production, we searched for large deletions of mtDNA by PCR as well as point mutations by sequencing (4,26). No deletions were observed (data not shown), however, sequencing of the mitochondrial genome revealed two novel and possibly deleterious variants in the cHL cells. No such variants were detected in the three control cell lines from healthy donors, except for one apparently homoplasmic change in control 1, m.1147G>A, a very rare but functionally silent MT-RNR1 variant which has been reported in an Iranian individual with unclear hearing loss (<http://www.mitomap.org>, 2019).

In L428 cells, we identified a novel homoplasmic variant in the MT-RNR2 gene, m.1782G>A (Figure 1C), and found decreased levels of both mitochondrial ribosomal RNAs, 12S rRNA, encoded by the wt MT-RNR1 gene as well as 16S rRNA, encoded by the mutated MT-RNR2 gene (Figure 1D and E).

A missense variant in the MTCO2 gene, m.8133C>T p.(Thr183Ile) was found in L1236 cells. The MutPred score of 0.65 associated with this change suggests a mildly deleterious effect on protein function, but it should be noted that a small number of common haplogroup markers have MutPred scores in this range (28). The m.8133C>T variant is present at homoplasmic levels and is listed on the MITOMAP database as a polymorphism but with very low associated frequency data ($n = 2$). The predicted effect at the protein level is the substitution of a moderately conserved threonine residue (polar uncharged) with an isoleucine residue (hydrophobic). In silico analysis by Alamut Visual 2.10 is not strongly supportive of pathogenicity for the m.8133C>T variant, SIFT suggests it may affect protein function, whilst PolyPhen 2 and Align GVGD both suggest that this variant is most likely tolerated.

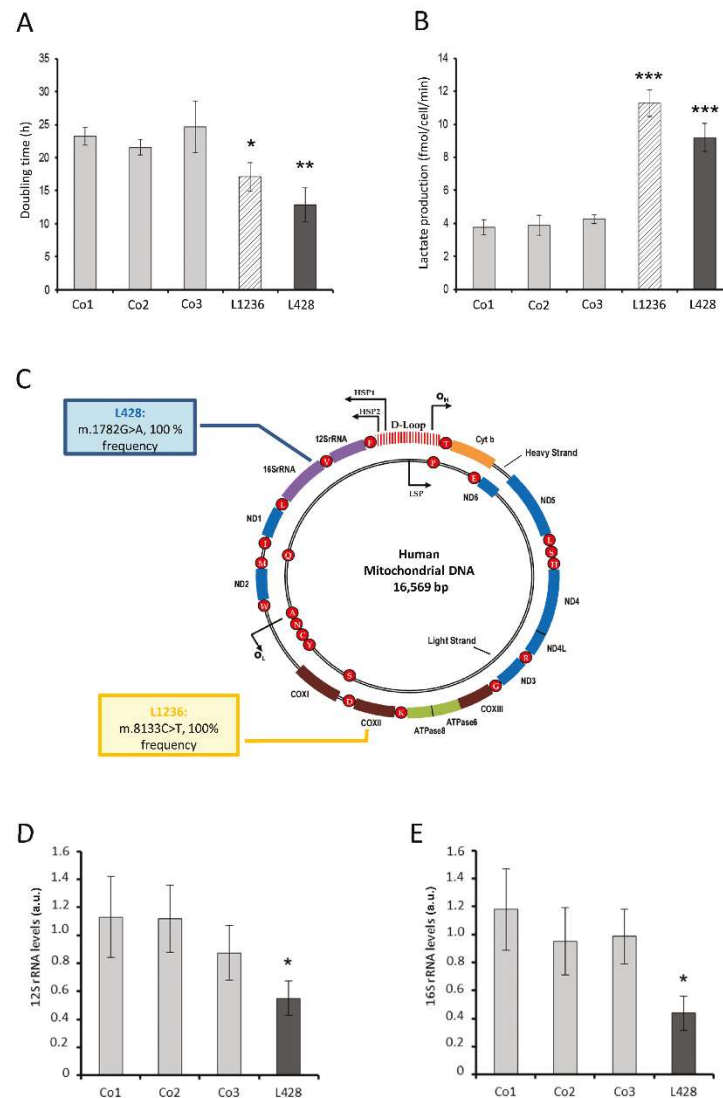


Figure 1. Lymphoma cells use aerobic glycolysis for proliferation and carry variants in mitochondrial genes. (A) Doubling time and (B) amount of lactic acid produced by cHL cells (L1236, L428) in comparison to normal B cells. (C) Novel mtDNA variants carried by the different cHL cell lines. (D and E) Levels of 12S and 16S rRNA in L428 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

In summary, our analyses suggest the presence of at least one alteration in the mitochondrial genome in each of these two cHL cell lines.

mtDNA variants in cHL cells lead to defects in RC complex levels

To investigate the functional consequences of these mtDNA variants, we first determined steady-state levels of index subunits representative for the five OXPHOS complexes.

L1236 cells, harboring the m.8133C>T variant in the MTCO2 gene, showed strongly reduced levels of the COX2 protein, indicating that the variant severely impairs its stability. In addition, COX1, but also NDUFA9, NDUFV2 and NDUFB8 levels, other subunits of RC complexes IV and I, were lower in L1236 cells (Figure 2A), showing that not only complex IV, but also complex I is affected in these cells.

In L428 cells, harboring a homoplasmic variant in the MT-RNR2 (m.1782G>A) gene, steady-state levels of mtDNA-encoded

complex IV subunits COX1, COX2 and nuclear-encoded COX4 were significantly decreased, while other mitochondrial proteins were not altered (Figure 2A), probably reflecting the high turnover of complex IV (25).

To examine how changes of individual subunit levels affect assembly of high molecular weight RC complexes and supercomplexes, we performed BN-PAGE followed by western blot analysis (Figure 2B). In L1236 cells, all investigated complexes and supercomplexes (CI, CIII₂, CIV and CIII₂CIV) were lower compared with controls, thus exhibiting a severe RC defect, in accordance with its high lactate production rate (Figure 1B). In L428 cells, levels of the assembled complexes III, and IV were quite normal, while the smaller supercomplex CIII₂CIV was decreased. Taken together, both observed variants impair the assembly of the affected complex as well as of other RC complexes.

mtDNA variants do not result in functional or respiratory defects

To assess the effect of these mtDNA variants on mitochondrial functionality and cell growth, cHL cells were cultured in media containing galactose. Since conversion of galactose to glucose is slow, cells are forced to use mitochondrial OXPHOS to produce ATP instead of relying completely on aerobic glycolysis. Surprisingly, both cHL cell lines did not show growth defects (Figure 2C), despite the observed RC defects, and the L428 cells grew even better in galactose containing media compared with the control lines, while the most glycolytic cell line L1236 displayed similar growth. Consistent with these results, L428 lymphoma cells exhibited higher oxygen consumption

rates, while the L1236 cells respired as much as control cells (Figure 2D). These findings indicate that despite the effects on the subunit or supercomplex steady-state levels (Figure 2A and B), the OXPHOS system is sufficient to maintain respiration and growth, even under oxidative conditions.

To further emphasize this, cells were grown in 2-deoxyglucose instead of glucose to block conversion of glucose to pyruvate. We found that cells grew as well under these conditions indicating that combustion of fatty acids and amino acids by OXPHOS is sufficient for growth (Supplementary Figure 1, available at *Carcinogenesis* Online).

Recently, it was reported in the same cHL cell lines that several mitochondrial proteins as well as key players regulating mitochondrial biogenesis like PGC-1 α and mitochondrial mass were markedly increased when compared with primary, short-term cultured B cells freshly isolated from tonsillar tissue (18). Indeed, we show here that mtDNA copy number was significantly higher in L428 cells, but not altered in L1236 cells (Figure 3A), in agreement with highly elevated levels of mitochondrial transcription factor A in L428 cells, a highly abundant nucleoid protein wrapping mtDNA (compare with Figure 5B in (18)). Consistent with the higher mtDNA copy number, levels of both mtDNA-encoded transcripts ND4 (complex I) and COX1 (complex IV) were increased in L428 cells, whereas levels of representative transcripts encoded by the nuclear genome were found to be unchanged (Figure 3C). L1236 cells also showed higher levels of mtDNA-encoded transcripts and, in addition, the nuclear DNA (nDNA)-encoded transcripts UQCRC (complex III) and COX4 (complex IV) were increased (Figure 3B). NRF-1 mRNA

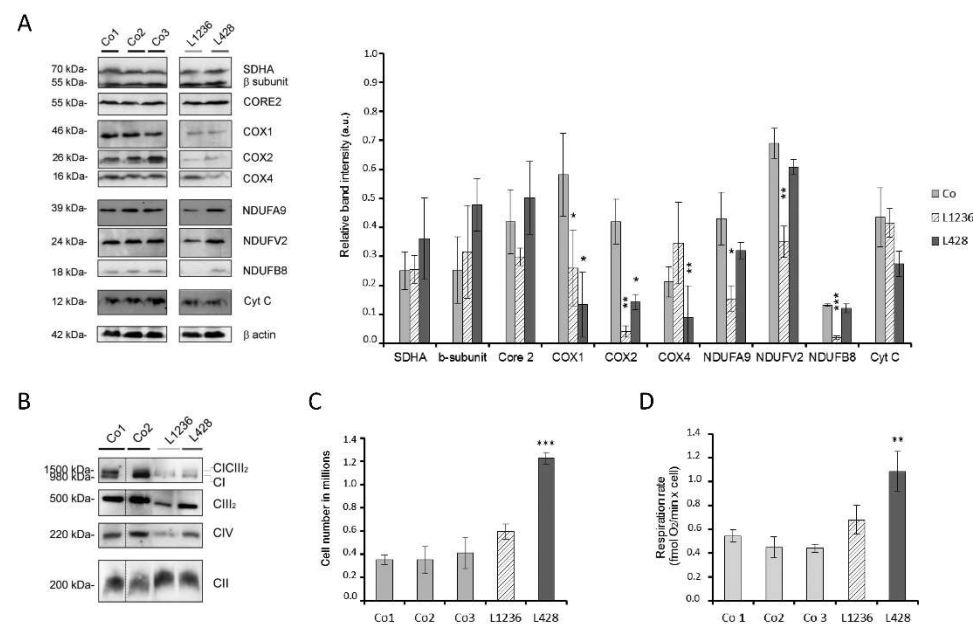


Figure 2. mtDNA variants in cHL cells lead to assembly defects of RC complexes, but do not result in functional defects. (A) Steady-state protein levels of index subunits of the five OXPHOS complexes and quantitative analysis (right panel). (B) Blue native PAGE showing the assembly of high molecular weight RC complexes and supercomplexes. (C) Growth of cHL cells in galactose-based, glucose-free medium, forcing the cells to use OXPHOS for ATP production. (D) Oxygen consumption rates of cHL cells compared with controls. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

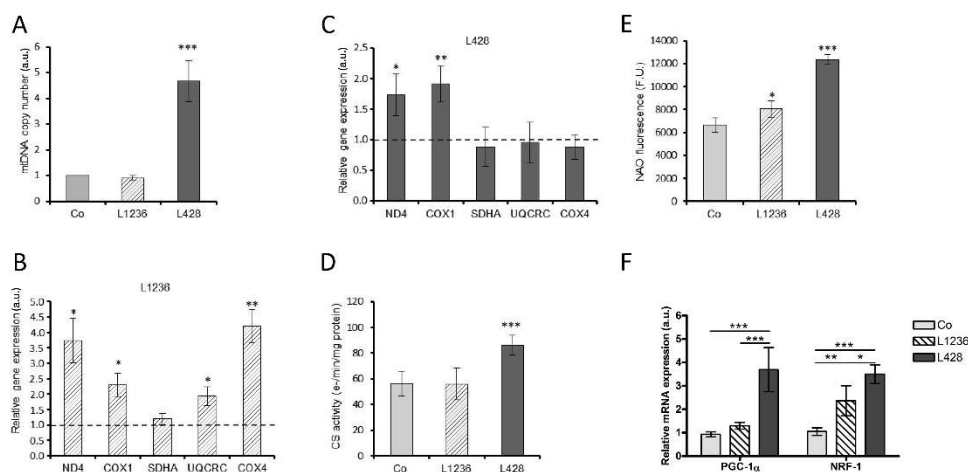


Figure 3. RC defects induce a compensatory stimulation of the mitochondrial gene expression program. (A) mtDNA copy number in cHL cell lines compared with the three control cell lines. (B and C) Levels of mtDNA-encoded (ND4, complex I and COX1, complex IV) and nuclear-encoded transcripts (UQCRC, complex III, SDHA, complex II and COX4, complex IV) of OXPHOS subunits in L1236 (B) and L428 cells (C). The dotted line indicates the level of expression of the control cell lines. (D) Citrate synthase (CS) activity in cHL cell lines compared with three controls. (E) NAO fluorescence intensity as a marker for inner mitochondrial membrane mass in cHL cell lines compared with three controls. (F) mRNA expression levels of PGC-1 α and NRF-1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

expression was significantly increased in both cHL lines and a significant increase in PGC-1 α mRNA expression was found in the L428 line (Figure 3F). Taken together, the RC assembly defect caused by the mtDNA variants obviously induces a compensatory stimulation of the gene expression program, albeit with different contributions of mitochondrial and nuclear genomes.

To investigate whether this results in increased mitochondrial content, we measured citrate synthase activity, a frequently used marker for mitochondrial mass, which was enhanced in L428 but not in L1236 cells (Figure 3D). Similar results were obtained with flow cytometric analysis using 10-NAO, a fluorescent indicator for the inner membrane lipid cardiolipin (Figure 3E). NAO fluorescence intensity was higher in L428 and slightly increased in L1236 cells. In summary, the observed variants in cHL cells induce a response, resulting in increased mitochondrial mass and respiration rates, most pronounced in L428 cells.

Knockdown of the NDUFV2 gene in L428 cells further stimulates mitochondrial biogenesis

Based on these findings, we hypothesized that the primary defects caused by the mtDNA variants evoked a retrograde signaling response, which in turn upregulates mitochondrial biogenesis, which may be beneficial for rapid growth. To test this hypothesis, we further increased the severity of the mitochondrial defect by knocking-down expression of the NDUFV2 gene in the L428 cell line (L428 NDUFV2KD), encoding a subunit assembled in the late steps of the complex I assembly line (29). Western blot analysis revealed that levels of NDUFV2 were strongly reduced, however the protein was not completely depleted in L428 NDUFV2KD cells (Figure 4A). Levels of other RC subunits NDUFA9 (complex I), CORE-2 (complex III) and COX4 (complex IV) were concomitantly decreased (Figure 4A) due to the instability of supercomplexes in the absence of appropriate binding partners, as shown by us previously (25). Because

of the further impairment of RC assembly, RTqPCR analysis indeed showed higher expression levels of transcription factors responsible for mitochondrial biogenesis (PGC-1 α and NRF-1) and of other RC subunits (NDUFA9, UQCRC2 and COX4) in L428 NDUFV2KD cells compared with L428, indicating an additional stimulation of the mitochondrial biogenesis program (Figure 4B). Furthermore, we observed a further increased mitochondrial mass (Figure 4C) and higher respiration rates (Figure 4D). L428 NDUFV2KD cells also showed significantly reduced doubling time compared with controls (Figure 4E), probably due to an increase in glycolysis, supported by the enhanced doubling time when L428 NDUFV2KD were grown in medium with 2-deoxyglucose (Supplementary Figure 2, available at Carcinogenesis Online).

Growth and tumor formation capacity of cHL cells depend on the OXPHOS system

To examine the ability of these cHL cells to form tumors *in vivo*, they were subcutaneously injected into the flanks of immunodeficient mice, and tumor growth was monitored every second or third day. Injection of L428 cells induced tumors after 14 ± 1 days (Figure 5A, left panel), that exhibited a moderate growth rate resulting in small tumor volumes after 27 days (Figure 5A, right panel). In contrast, no tumors were detected in mice after inoculation of the L1236 cells even at 31 days (Figure 5A). These data suggest that also *in vivo*, growth and thus tumorigenic potential of cHL cells is enhanced by the enhanced mitochondrial mass and OXPHOS activity observed in the L428 cell line *in vitro*, while L1236 cells with an mtDNA mutation more severely affecting the RC and only moderately stimulated biogenesis cannot form tumors *in vivo*.

To investigate whether the further increase of mitochondrial mass and function would lead to even enhanced tumor formation, we then injected L428 NDUFV2KD cells into immunodeficient mice. L428 NDUFV2KD cells induced tumors within a much shorter period (5 days), and these tumors exhibited a

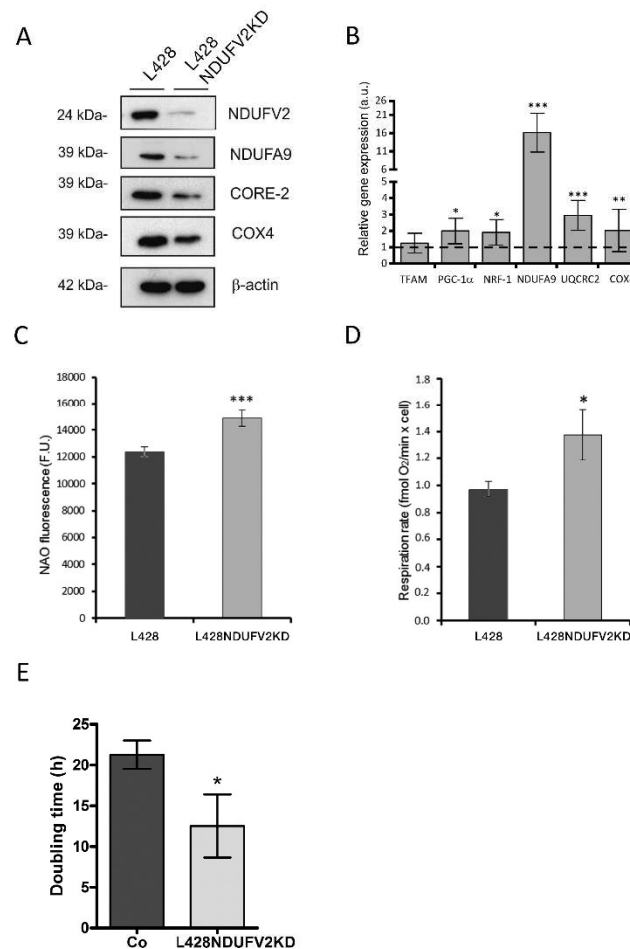


Figure 4. Knockdown of the NDUFV2 gene in L428 cells further stimulates mitochondrial biogenesis. (A) CRISPR-Cas9 mediated knockdown of the NDUFV2 gene in the L428 cHL cell line; western blot showing strongly reduced expression of the NDUFV2 protein in L428 NDUFV2KD cells, as well as of subunits of other complexes. (B) qPCR analyzing the expression of transcription factors responsible for mitochondrial biogenesis (PGC-1α and NRF-1) and other RC subunits (NDUFV2, UQCRC2 and COX4) in L428 NDUFV2KD cells. The dotted line indicates the level of expression of the L428 cell line. (C) Mitochondrial mass measured by fluorescence-activated cell sorting analysis of NAO fluorescence. (D) Respiration rate in L428 NDUFV2KD cells compared with L428 cells. (E) Doubling time of L428 NDUFV2KD cells in comparison to normal B cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

much higher growth rate than those derived from L428 cells (Figure 5B). As most of the tumors became necrotic and mice suffered from paralysis and fatigue, animals had to be killed 22 days after transplantation.

To test whether further impairment of OXPHOS and mitochondrial function would affect tumor growth, metformin was given to mice injected with L428 cells. Metformin had been shown to inhibit complex I activity in many cell types and reduced respiration in our cultured cHL cells (L428 cells: 1.28 ± 0.24 fmol O₂/min/cell versus L428 + metformin 1 mM: 0.816 ± 0.16 fmol O₂/min/cell; $P < 0.05$) (30). Tumors exhibited significant growth reduction when treated with metformin (Figure 5C), likely due to further impairment of OXPHOS.

In contrast, when a version of the L428 cell line expressing the NDI1 protein, making cells metformin resistant (L428 NDI1-BFP), was inoculated, tumor growth was not reduced by metformin treatment (tumor volumes in mm³: L428: 542 ± 312 versus L428 NDI1: 553 ± 272 ; Figure 5D, not significant). These data indicate that inhibition of respiration leads to decreased progression of cHL tumors *in vivo*.

Discussion

Mutations in mtDNA, which is present in thousands of copies per cell, occur at high frequency in human tumors and were implicated in tumorigenesis for a long time (10,11), however

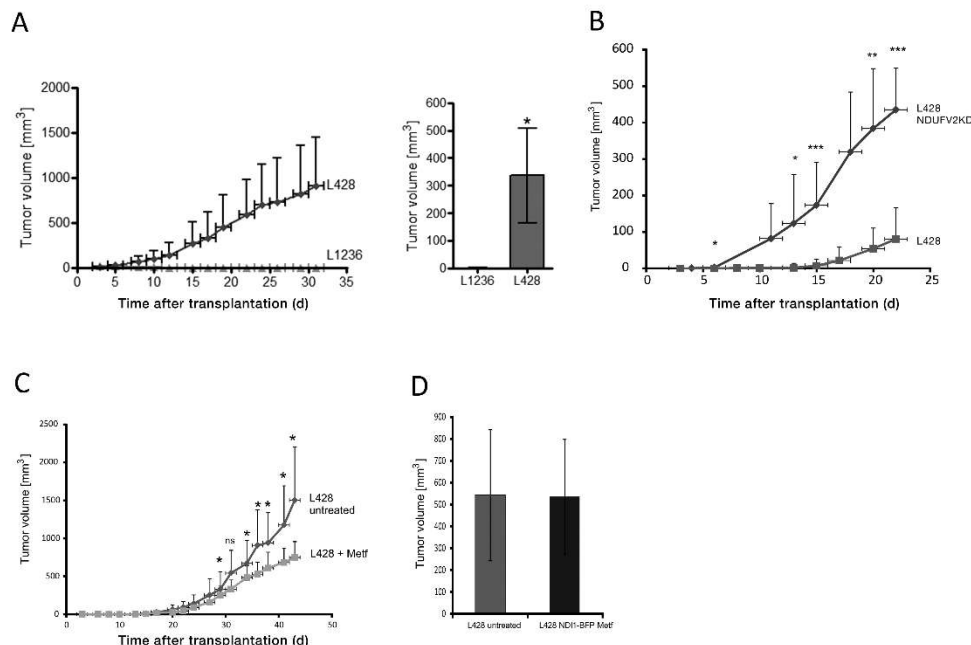


Figure 5. Growth and tumorigenesis of cHL cells depend on the OXPHOS system in vivo. (A) Tumor growth after injection of cHL cells over the time of 31 days (left panel). Tumor volume 27 days after cHL cells injection (right panel). (B) Tumor growth after injection of L428 NDUFB2KD cells compared with normal L428 cells. (C) Tumor growth in mice injected with L428 cells, untreated or treated with metformin in drinking water. (D) Tumor growth in mice injected with L428 cells (untreated) and metformin-treated mice injected with L428 NDUFB2KD cells (insensitive to metformin). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

major arguments have also been raised against this hypothesis (12,31,32). There is strong evidence that these variants arise randomly in founder cells, are amplified and can be taken to homoplasmy by clonal expansion during the many cell divisions which take place until a solid tumor is formed (33,34). The likely cause of such mtDNA variants was revealed by Ju *et al.* showing that the majority is introduced by errors of mtDNA polymerase γ during mtDNA replication (10,11). However, the functional consequences and role of these variants in cancer remain unclear. Indeed, our study confirmed that also well-established cHL lines, which have been used extensively in the past as model cells for Hodgkin lymphoma, harbor mtDNA variants, which result in RC assembly defects (Figure 2A and B). However, these do not inactivate mitochondrial energy metabolism on the functional level, but rather evoke a retrograde response which upregulates mitochondrial biogenesis and leads to enhanced mass and function. This gives the cells a proliferative advantage, both in vitro (Figures 1A and 2C) and in vivo (Figure 5), if the mtDNA mutation is not too severely affecting RC function, as is the case for the L1236 cell line. Indeed, mitochondrial dysfunction has been reported to influence nuclear gene expression through retrograde signaling in yeast (35), nematode (36) and also in mammalian systems (37) and increased mitochondrial biogenesis is commonly observed in tissues of patients suffering from mitochondrial diseases, as exemplified by massive proliferation of mitochondria in skeletal muscle fibers, the so-called ragged-red fibers.

In these patients, it is assumed that an increased mitochondrial content is a compensatory strategy to pay off for an OXPHOS defect. However, the response depends on the severity of the genetic defect: If it is mild, increased biogenesis would help to recover sufficient mitochondrial function needed for cell growth. Indeed, in an elegant study Picard *et al.* analyzed a series of hybrid cell lines containing a putatively lethal mtDNA mutation ranging from 20 to 100% mutation load. They showed upregulation of mitochondrial biogenesis by transcriptional reprogramming at 50–90% mutation load, which results in relatively modest OXPHOS defects, but sharp transitions in cellular phenotype and gene expression, e.g. induction of glycolytic genes, increased mtDNA and mRNA levels (38). In contrast, a 100% mtDNA mutation load was lethal in these model cells, consistent with our data showing that a severe defect, as observed in L1236 cells, causes no benefit for cancer cells, which is also supported by data observed previously (10,11).

The fact that L428 cells displayed decreased levels of both 12S and 16S mt-rRNAs (Figure 1D and E) was the first direct piece of evidence in favor of a disruptive role for the m.1782G>A mutation. The decrease in the levels of both mitochondrial rRNAs was likely not the result of reduced transcription of mtDNA, as the levels of other mtDNA-encoded transcripts were even increased, in line with the important increase in mtDNA levels observed in these cells (Figure 3A and C). Not surprisingly, the decrease in the amount of mitochondrial rRNAs was mirrored by a concomitant reduction in the steady-state levels of mtDNA-encoded proteins

(Figure 2A), leading to lowered amounts of assembled CI and CIV complexes but not of CII and CIII (Figure 2B). A remarkably similar phenotype was observed in MRPS2-, MRPS22- and MRPS34-deficient subjects (39–41). Additionally, a generalized decrease in the levels of all mtDNA-encoded proteins was observed in a patient carrying a non-sense mutation in MRPS1, upon *in vitro* depletion of the peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, and in the case of the well-known MT-RNR1 (m.1555A>G) mutation (42–44). In summary, a generalized reduction in steady-state levels of mtDNA-encoded proteins, followed by a decrease in the levels of OXPHOS complexes CI and CIV, but not of CII and CIII, appears to be a hallmark for defective mitochondrial translation. Thus, our data are in strong agreement with the idea that the MT-RNR2 m.1782G>A variant imposes a general blockade on the translation of mtDNA protein coding genes. As a result, the m.1782G>A MT-RNR2 variant is one of the very few variants in the mitochondrial rRNA genes with proven pathogenic character, making the L428 cell line invaluable for further studies aimed at understanding mitochondrial translation and its regulation. At this point, it is not clear whether the defect introduced by m.1782G>A occurs (i) at the level of assembly of the mitoribosomal particles, (ii) during mitochondrial translation or (iii) both. The fact that position m.1782G is involved in the stabilization of a conserved structural RNA element that brings together several distant regions of 16S rRNA, suggests that the correct folding of the molecule might be compromised. Given the high conservation of the nucleotide and the surrounding structure, recreating the m.1782G>A mutation in a heterologous organism could be an obvious avenue to shed additional light onto the nature of its pathogenicity.

It has been argued that accumulation of misfolded or damaged proteins in mitochondria results in the activation of a retrograde signaling pathway called mitochondrial unfolded protein response, UPR^{mt}. This mitochondrial stress signaling pathway can also be triggered by imbalances in OXPHOS components and by defective mitochondrial translation (36). In principle, both L428 and L1236 cells could trigger UPR^{mt}. However, when the relative expression of nuclear and mitochondrial genes was measured, it was found that only mtDNA-encoded genes were overexpressed in L428 cells (Figure 3C), whereas both mtDNA-encoded and nuclear-encoded mitochondrial genes were overexpressed in L1236 cells (Figure 3B). These results strongly suggest that two different types of retrograde signaling might be occurring in the studied cell lines. When RC activity was impaired by interfering with mitoribosomal activity, as in the case of L428 cells, increased levels of mtDNA, followed by upregulated transcripts of only mitochondrially encoded genes ensued (Figure 3A and C), together with an increase in mitochondrial mass and even increased respiration (Figure 2D). In contrast, when the mitochondrial insult was provoked by an imbalance in the composition of complex IV, as in L1236 cells, increased transcription of a larger set of mitochondrial genes ensued, including both nDNA and mtDNA-encoded genes. No increase in mtDNA levels was observed in these cells. This observation was confirmed in the L428 NDUFV2KD cell line with a knockdown of the nDNA-encoded NDUFV2 subunit of complex I, effectively adding a defect in one of the OXPHOS components on top of the mitochondrial translational insult caused by the m.1782G>A MT-RNR2 variant. In this cell line, the expression of the nDNA-encoded transcripts NDUF9, UQCRC (Core-2) and COX4 was increased (Figure 4A), in line with the results observed in L1236 cells. We interpret these results as the consequence of activating the retrograde response observed in L1236 cells on top of the different response originally displayed by L428 cells.

In summary, our results show that different mitochondrial insults, such as a general translation defect versus an imbalance in the composition of complexes I or IV can lead to different retrograde signaling pathways. Besides these retrograde responses, a mitochondrial translational plasticity pathway that enables adaptation of mitochondrial protein synthesis to the influx of nuclear-encoded subunits has been recently described (45). Whether this pathway might be in effect in L1236 or L428 NDUFV2KD cells is currently unknown. The mutant cell lines described in this work promise to become invaluable tools to elucidate the nature of these still elusive signaling pathways affecting the interaction between the nucleus and the mitochondrial network.

The increase in mitochondrial mass could be due to increased mitochondrial biogenesis, decreased mitochondrial clearance by autophagy or both. Birkenmeier *et al.* showed that master regulators of the mitochondrial biogenesis program, the coactivators PGC-1 α , PGC-1 β and NRF transcription factors are massively increased in the same cell lines as we used, compared with primary B cells, and confirmed this by immunohistochemistry comparing tonsillar tissue to lymph nodes of Hodgkin lymphoma patients (18). Here, we show that further interfering with RC assembly by knocking-down NDUFV2 in the L428 cell line (Figure 4A) increases transcript levels of PGC-1 α and NRF-1 (Figure 4B), emphasizing that this retrograde response in general involves activation of the mitochondrial biogenesis program. In addition, Birkenmeier *et al.* more recently showed also that autophagy is increased in these cell lines (46), finally pointing to an enhanced mitochondrial turnover in order to keep a functioning total organelle pool.

Two important questions remain: Why do cHL tumor cells, which probably derive from (post)germinal center B cells (18), use this seemingly cumbersome mechanism to increase mitochondrial mass and why is this essential for tumor formation? Recently, the metabolic features of normal B cells were studied during the various stages of their development, from (i) slowly cycling pro-B cells in the bone marrow via (ii) germinal center B cells in the spleen to finally (iii) mature, highly anabolic antibody producing plasma cells, which encounter very different oxygen concentrations in their environment. Mielenz' work shows that mitochondrial activity decreases when pro-B cells progress to immature B cells in the bone marrow, while during maturation of B cells following LPS stimulation *in vitro* an impressive upregulation of both, glycolytic flux yielding lactate as well as RC activity, is observed (47–49). Therefore, B cells indeed adapt their mitochondrial equipment to different demands. However, maturation not only includes extremely high proliferative activity, but also a switch to massive anabolic activity to produce antibodies. Therefore, we postulate that successful cHL founder cells derived from (post)germinal center B cells cannot activate the physiologically used mechanism. Instead, mitochondrial mass needed for proliferation is increased using retrograde signaling pathways when harboring mildly deleterious mtDNA variants. In addition, stimulation of the nuclear factor-kappaB pathway was demonstrated in these cell lines, and it remains to be shown if reactive oxygen species from these mitochondria could drive its activation (18).

Finally, why is high mitochondrial mass beneficial for proliferation? Mitochondrial metabolism has traditionally been considered mainly for its catabolic functions and only recently for anabolic functions, essential for rapidly proliferating cancer cells, providing amino acids and acetyl-CoA derived from glucose as well as glutamine for the synthesis of proteins, nucleotides and membrane lipids, respectively (3,5). Therefore, we

conclude that in the presence of mtDNA mutations cHL cancer cells increase mitochondrial mass using retrograde signaling pathways to optimally fulfill these requirements.

Supplementary material

Supplementary data are available at *Carcinogenesis* online.

Funding

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation: Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-associated Diseases—CECAD) and Project-ID 73111208—SFB 829 to J.B., J.K. and R.J.W., Deutsche Krebshilfe (H.K. and R.J.W.), Else Kröner-Fresenius-Stiftung (2016-Kolleg-19 to J.K.) and the Center of Molecular Medicine Cologne of the Medical Faculty (CMMC; H.A., H.K. and R.J.W.). The skillful technical assistance of Katrin Lanz and Maria Bust is gratefully acknowledged. E.L.W. and R.W.T. are supported by the Wellcome Centre for Mitochondrial Research (203105/Z/16/Z), the Medical Research Council (MRC) International Centre for Genomic Medicine in Neuromuscular Disease, Mitochondrial Disease Patient Cohort (UK) (G0800674), the Lily Foundation, the UK National Institute for Health Research Biomedical Research Centre for Ageing and Age-related disease award to the Newcastle upon Tyne Foundation Hospitals National Health Service (NHS) Trust, the MRC/Engineering and Physical Sciences Research Council Molecular Pathology Node and the UK NHS Highly Specialized Service for Rare Mitochondrial Disorders of Adults and Children.

Acknowledgements

The gifts of Epstein-Barr virus-transformed B cells from healthy donors by Prof. B. Wirth, Cologne, Germany, as well as of the NDI1 vector kindly provided by Prof. N. Chandel, Chicago, USA, are gratefully acknowledged.

Authors' contributions

S.H. performed research, analyzed data and drafted the manuscript; J.B., A.B., A.V.S., J.L.E., R.W.T., N.R. and H.A. performed research, analyzed and interpreted data, H.K. designed research and interpreted data, R.J.W., J.B. and J.K. designed research, interpreted data and finalized the article.
Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Hanahan, D. et al. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646–674.
- Warburg, O. et al. (1927) The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.*, 8, 519–530.
- Zhang, J. et al. (2017) Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J.*, 36, 1302–1315.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309–314.
- Vander Heiden, M.G. et al. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029–1033.
- Wallace, D.C. (2012) Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 12, 685–698.
- Kim, H.S. et al. (2010) SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*, 17, 41–52.
- Kloosterhof, N.K. et al. (2011) Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol.*, 12, 83–91.

- Lussey-Lepoutre, C. et al. (2015) Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism. *Nat. Commun.*, 6, 8784.
- Ju, Y.S. et al. (2014) Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife*, 3, e02935.
- Stewart, J.B. et al. (2015) Simultaneous DNA and RNA mapping of somatic mitochondrial mutations across diverse human cancers. *PLoS Genet.*, 11, e1005333.
- Salas, A. et al. (2014) The saga of the many studies wrongly associating mitochondrial DNA with breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 659.
- Cormio, A. et al. (2012) Mitochondrial DNA content and mass increase in progression from normal to hyperplastic to cancer endometrium. *BMC Res. Notes*, 5, 279.
- Sotgia, F. et al. (2012) Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the “reverse Warburg effect” in positive lymph node tissue. *Cell Cycle*, 11, 1445–1454.
- Huebbers, C.U. et al. (2015) High glucose uptake unexpectedly is accompanied by high levels of the mitochondrial β -F1-ATPase subunit in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 6, 36172–36184.
- LeBleu, V.S. et al. (2014) PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.*, 16, 992–1003, 1–15.
- Tan, A.S. et al. (2015) Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.*, 21, 81–94.
- Birkenmeier, K. et al. (2016) Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma are highly dependent on oxidative phosphorylation. *Int. J. Cancer*, 138, 2231–2246.
- Elson, J.L. et al. (2015) The presence of highly disruptive 16S rRNA mutations in clinical samples indicates a wider role for mutations of the mitochondrial ribosome in human disease. *Mitochondrion*, 25, 17–27.
- Smith, P.M. et al. (2014) The role of the mitochondrial ribosome in human disease: searching for mutations in 12S mitochondrial rRNA with high disruptive potential. *Hum. Mol. Genet.*, 23, 949–967.
- Sim, N.L. et al. (2012) SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.*, 40(Web Server issue), W452–W457.
- Adzhubei, I.A. et al. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*, 7, 248–249.
- Tavtigian, S.V. et al. (2006) Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J. Med. Genet.*, 43, 295–305.
- Lott, M.T. et al. (2013) mtDNA variation and analysis using mitomap and mitomaster. *Curr. Protoc. Bioinform.*, 44, 1.23.1–1.23.26.
- Hornig-Do, H.-T. et al. (2012) Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *EMBO J.*, 31, 1293–1307.
- Neuhaus, J.F. et al. (2014) Catecholamine metabolism drives generation of mitochondrial DNA deletions in dopaminergic neurons. *Brain*, 137 (Pt 2), 354–365.
- Buzzai, M. et al. (2007) Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.*, 67, 6745–6752.
- Venter, M. et al. (2017) Using MutPred derived mtDNA load scores to evaluate mtDNA variation in hypertension and diabetes in a two-population cohort: the SABPA study. *J. Genet. Genomics*, 44, 139–149.
- Guerrero-Castillo, S. et al. (2017) The assembly pathway of mitochondrial respiratory chain complex I. *Cell Metab.*, 25, 128–139.
- Cameron, A.R. et al. (2018) Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biol.*, 14, 187–197.
- Greaves, L.C. et al. (2012) Comparison of mitochondrial mutation spectra in ageing human colonic epithelium and disease: absence of evidence for purifying selection in somatic mitochondrial DNA point mutations. *PLoS Genet.*, 8, e1003082.
- Pereira, L. et al. (2012) Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncogenic phenotype: pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors. *BMC Cancer*, 12, 53.
- Elson, J.L. et al. (2001) Random intra-cellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am. J. Hum. Genet.*, 68, 802–806.

34. Gekeler, J. et al. (2009) Clonal expansion of different mtDNA variants without selective advantage in solid tumors. *Mutat. Res.*, 662, 28–32.
35. Liu, Z. et al. (2006) Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 159–185.
36. Durieux, J. et al. (2011) The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*, 144, 79–91.
37. DiMauro, S. et al. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.*, 348, 2656–2668.
38. Picard, M. et al. (2014) Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E4033–E4042.
39. Gardeitchik, T. et al. (2018) Bi-allelic mutations in the mitochondrial ribosomal protein MRPS2 cause sensorineural hearing loss, hypoglycemia, and multiple OXPHOS complex deficiencies. *Am. J. Hum. Genet.*, 102, 685–695.
40. Smits, P. et al. (2011) Mutation in mitochondrial ribosomal protein MRPS22 leads to Cornelia de Lange-like phenotype, brain abnormalities and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.*, 19, 394–399.
41. Lake, N.J. et al. (2017) Biallelic mutations in MRPS34 lead to instability of the small mitoribosomal subunit and Leigh syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 101, 239–254.
42. Miller, C. et al. (2004) Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann. Neurol.*, 56, 734–738.
43. Richter, R. et al. (2010) A functional peptidyl-trNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *EMBO J.*, 29, 1116–1125.
44. Guan, M.X. et al. (2000) A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1787–1793.
45. Richter-Dennerlein, R. et al. (2016) Mitochondrial protein synthesis adapts to influx of nuclear-encoded protein. *Cell*, 167, 471–483.e10.
46. Birkenmeier, K. et al. (2016) Basal autophagy is pivotal for Hodgkin and Reed-Sternberg cells' survival and growth revealing a new strategy for Hodgkin lymphoma treatment. *Oncotarget*, 7, 46579–46588.
47. Stein, M. et al. (2017) A defined metabolic state in pre B cells governs B-cell development and is counterbalanced by Swiprosin-2/EFhd1. *Cell Death Differ.*, 24, 1239–1252.
48. Urbanczyk, S. et al. (2018) Regulation of energy metabolism during early B lymphocyte development. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, E2192.
49. Caro-Maldonado, A. et al. (2014) Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J. Immunol.*, 192, 3626–3636.

4. Diskussion

4.1. mtDNA Mutationen in Tumoren

Mutationen der mtDNA treten in menschlichen Tumoren regelhaft auf und wurden ursprünglich als ein Pathomechanismus der Tumorentstehung betrachtet.^{48,49} Es gibt aber auch Befunde, die dieser Hypothese widersprechen.^{51,53,54} Für die von uns untersuchten HRS-Zellreihen L428 und L1236, welche bereits in der Vergangenheit häufig als Modell für cHL in der Forschung verwendet wurden und aus Patientenzellen etabliert wurden, konnten wir das Vorliegen von mtDNA Mutationen nachweisen. Ebenso konnten wir zeigen, dass die gezeigten Mutationen in unseren Zellreihen zur Störung beim Aufbau der mitochondrialen Atmungskette führten. Die beiden nachgewiesenen Mutationen in der in den Zellen L428 und L1236 unterscheiden sich und scheinen unterschiedliche Auswirkungen auf die OXPHOS zu haben.

Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass die Mutationen zufällig bei einer der zahlreichen Zellteilungen, welche eine veränderte Zelle auf dem Weg zu einem soliden Tumor durchläuft, entstehen, im Verlauf amplifiziert werden und schließlich homoplastisch werden.^{55,56} Die Mechanismen hinter der Entstehung wurden genauer von Ju et al. beleuchtet und es scheint, als würde ein Großteil der Mutationen durch Fehler der mtDNA Polymerase gamma während der häufigen mtDNA Replikation während des rapiden Zellwachstums entstehen.^{48,49}

4.2. mtDNA Mutationen in Tumoren und ihre funktionellen Auswirkungen

Die funktionellen Auswirkungen und die genaue Rolle der mtDNA Mutationen bei der Tumorentstehung sind bisher nicht abschließend verstanden. Interessanterweise wurde für die von uns untersuchten Zellreihe L428 gezeigt und bereits im Vorfeld der durchgeführten Experimente publiziert, dass diese Zellreihe keine Einschränkung der mitochondrialen Funktionen zeigen, sondern im Gegenteil eine gesteigerte Atmungskettenfunktion und eine gesteigerte Biomasse aufweist. Dies scheint den Zellen *in vitro* und *in vivo* einen Wachstumsvorteil zu geben, solange die Mutationen nicht zu schwerwiegende Auswirkungen auf die OXPHOS führen. Dieser Fall scheint auf die von uns untersuchte Zellreihe L1236 zuzutreffen. Auch diese Zelllinie zeigte in unseren Untersuchungen weder eine gesteigerte Atmungskettenfunktion noch eine gesteigerte Biomasse gegenüber den Kontrollzellen. Unsere Arbeit reiht sich daher gut in die vorbeschriebene, neuere Hypothese, dass es verschiedenen Klassen von mtDNA Mutationen bei der Tumorentstehung zu geben scheint: schwerwiegendere Mutationen, die bei der Induktion der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen scheinen und weniger schwerwiegende Mutationen, die eher nützlich bei der Anpassung an die geänderten metabolischen Bedürfnisse der Zelle im Zuge einer Mutation relevant zu sein scheinen.³¹

4.3. mtDNA Mutationen zeigen unterschiedliche funktionelle Auswirkungen

Bei milden genetischen Defekten in der mtDNA kommt es vermutlich zu einer Kompensation durch Heraufregulation der mitochondrialen Biogenese, welche ausreichend ist, um eine basale mitochondriale Funktion für die ATP-Synthese wiederherzustellen. Dieser Kompensationsmechanismus wird auch regelhaft in Muskeln von Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen beobachtet. Als Ausgleich für den OXPHOS Defekt kommt es bei diesen Patienten zu einer massiven Vermehrung der sog. Ragged-red-Fibres, also sehr Mitochondrien-reicher Skelettmuskelfasern. Dass dieser Effekt abhängig von der Expression der schwerwiegenden Mutationen ist, konnte von Picard et al gezeigt werden: sie untersuchten als letal bekannte mtDNA Mutationen in Hybridzellen mit einem Anteil mutierter Kopien zwischen 20 und 100%. Eine Steigerung der mitochondrialen Biogenese ergab sich bei Kopienzahlen zwischen 50 und 90%. Diese Zellen waren gekennzeichnet durch milde OXPHOS Defekte bei schwerwiegenden Veränderungen im zellulären Phänotyp und in der Genexpression. Beispielsweise wiesen sie eine Induktion glykolytischer Gene und erhöhte Level an mtDNA und nukleärer Ribonukleinsäurestränge (nRNA) auf. Ein Mutationsgehalt über 90% führten zum Tod der Zellen.⁵⁷ Dieses Ergebnis ist konsistent mit unseren Beobachtungen in den L1236 Zellen und den vorbeschriebenen Daten^{31,48,49}: schwere Defekte in der mtDNA ergeben keinen metabolischen Vorteil für die Tumorzellen.

In den von uns untersuchten L428 Zellen konnten wir dagegen zeigen, dass die mtDNA Mutation m.1782G>A die Translation von mtDNA kodierten Genen zu blockieren scheint. Zunächst zeigten sich erniedrigte Level der 12S- und 16S-mt-rRNA. Dies war für uns der erste Hinweis auf einen pathogenen Einfluss durch die m.1782G>A Mutation. Die Erniedrigung der rRNAs scheint hierbei am ehesten keine Folge einer reduzierten Transkription von mtDNA zu sein, da andere mtDNA codierte Transkripte eher erhöht waren und die Kopienzahlen der mtDNA in den L428 Zellen gegenüber Kontrollzellen deutlich gesteigert waren. Es scheint sich somit vermutlich um ein Störung der Translation zu handeln: Durch die reduzierten Level an mtDNA-kodierten Proteinen in diesen Zellen kam es zu einer nachweisbaren und folgerichtigen Reduktion von Komplex I und Komplex IV, während Komplex II und III unverändert blieben. Ein erstaunlich ähnlicher Phänotyp zeigt sich in Patient:innen mit Schwerhörigkeit, Hypoglykämien und MRPS2-Mutationen⁵⁸, Patient:innen mit Cornelia-De-Lange-ähnlichem-Syndrom mit Gehirnveränderungen und hypertropher Kardiomyopathie mit MRPS22-Mutationen⁵⁹ und bei Patient:innen mit Leigh-Syndrom und MRPS34-Mutationen.⁶⁰ Ebenso konnte dies bei Patient:innen mit nonsense Mutationen in MRPS1^{61,62} und bei der gut charakterisierten MT-RNR1 (m.1555⁵⁸A>G) Mutation gezeigt werden. Hierbei konnte nachgewiesen werden, warum manche Patient:innen auf die Behandlung mit Aminoglykosiden eher mit einem Hörverlust reagieren als andere Patient:innen.⁶³ Zusammenfassend zeigen sich in all diesen Mutationen - analog zu den L428 Zellen - eine generelle Reduktion der

Translation mtDNA-codierter Gene mit reduzierter Proteinsynthese und daraus folgend einer Störung im Aufbau von Komplex I und IV

4.4. Retrograde Signalkaskaden und deren Einfluss auf die zellulären Reaktionen auf mtDNA Mutationen

Eine Koppelung mitochondrialer Dysfunktion über retrograde Signalwege an die nukleäre Genexpression mitochondrialer Gene ist in Hefen⁶⁴, Fadenwürmern⁶⁵ und Säugetierzellen⁶⁶ vorbeschrieben. Ebenso ist bekannt, dass die Akkumulation beschädigter Proteine zur Aktivierung eines retrograden Signalweges führt, der sogenannten unfolded protein response (UPR^{mt}). Diese kann nachweislich auch durch andere Stressoren wie OXPHOS-Veränderungen aktiviert werden.⁶⁵ Dies wäre im Prinzip ein möglicher Signalweg, welcher von den von uns untersuchten Zellreihen L428 und L1236 genutzt werden könnte. Bei der Messung der relativen Genexpression zeigten sich jedoch in L428 Zellen nur eine Überexpression von mtDNA-kodierten Genen, während sich in den L1236 Zellen die Expression von mtDNA und nukleär-kodierten Genen verändert zeigten. Dies lässt vermuten, dass die beiden Zellreihen unterschiedliche Signalwege nutzen. Wenn die Aktivität der Atmungskette durch die Beeinträchtigung der mitoribosomalen Aktivität gestört wurde, wie im Fall der L428-Zellen, kommt es zu erhöhten mtDNA-Kopienzahlen, gefolgt von einer Hochregulation der Transkripte ausschließlich mtDNA-kodierter Gene. Dies führt - gemeinsam mit einer Zunahme der mitochondrialen Masse - in der Endstrecke sogar zu einer gesteigerten Aktivierung der Atmungskette. Im Gegensatz dazu führt eine mitochondriale Schädigung durch ein Ungleichgewicht in der Zusammensetzung des Komplexes IV, wie bei den L1236-Zellen beobachtet, zur gesteigerten Transkription eines größeren Satzes mitochondrialer Gene, welche sowohl nDNA- als auch mtDNA-kodiert sind. Entsprechend wurde in L1236 Zellen keine Erhöhung der mtDNA-Level beobachtet. In den Knockout-Zellen L428NDUFV2 wurde die NDUFV2-Untereinheit des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette ausgeschaltet, was zu einem Defekt der OXPHOS führt. Diese Zellen zeigen analog zu den verwendeten L1236 Zellen eine gesteigerte Transkription auch nukleär-kodierter mitochondrialer Gene. Wir vermuten, dass die L428-Knockout-Zellen und die L1236-Zellen aufgrund der Schwere ihrer mtDNA Mutation ähnliche Signalwege nutzen.

Ob der von Richter-Dennerlein et al. beschriebene translationale Plastizitätssignalweg, welcher eine Anpassung der mitochondrialen Biosynthese an den Einstrom von nukleär-kodierten Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe zeigt, eine Rolle bei der Pathogenese in den von uns untersuchten Zellreihen spielt, bleibt zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt.⁶⁷ Interessanterweise konnte zuletzt gezeigt werden, dass Mutationen in den für die Polymerase gamma relevanten Genen, welche für die Replikation der mtDNA verantwortlich

ist, durch sogenannte ‚small molecules‘ aufgehoben werden können. Damit konnten Valenzuela et al. das erste Mal eine Therapie für einen Defekt in der Replikation von mtDNA zeigen.⁶⁸ Dies könnte auch in Zukunft ein interessanter Ansatzpunkt in der Therapie von mtDNA Veränderungen bei der Tumorentstehung spielen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass unterschiedliche Mutationen in der mtDNA veränderte funktionelle Auswirkungen haben, welche über unterschiedliche Signalwege ausgelöst werden.

4.5. cHL-Zellen zeigen eine Steigerung der mitochondrialen Biomasse

In den L428 Zellen konnten wir eine gesteigerte mitochondriale Biomasse nachweisen. Es war lange nicht geklärt, ob die Steigerung der mitochondrialen Biomasse in Tumorzellen durch eine vermehrte Biogenese oder durch einen verminderten Abbau, z.B. durch verminderte Autophagie entsteht, oder ob beide Mechanismen eine Rolle hierbei spielen. Für die von uns untersuchten HRS-Zellen konnten Birkenmeier et al. zeigen, dass die Signalfaktoren PGC-1alpha, PGC1-beta und NRF-Transkriptionsfaktoren deutlich vermehrt vorliegen.⁵² Als Vergleichsgruppe dienten auch in dieser Publikation primäre B-Zellen und die Steigerung dieser Signalfaktoren konnte auch in Lymphknotenmaterial von Patientinnen und Patienten mit HL bestätigt werden. Passend hierzu konnten auch wir gesteigerte PGC-1alpha und NRF-Niveaus in den L428NDUFV2-Zellen nachweisen. Es scheint daher naheliegend, dass die retrograden Signalwege zu einer Stimulation der Biogenese führen könnten. Diese Hypothese wird durch weitere Untersuchungen von Birkenmeier et al. unterstützt: in cHL-Zellen scheint eine basale Autophagie für das Tumorwachstum eine zentrale Rolle zu spielen und die Expression einiger Autophagie-relevanter Proteine zeigte sich gesteigert.⁶⁹ Die aktuellen Befunden weisen zusammenfassend darauf hin, dass ein gesteigerter Zellumsatz mit vermehrter Biogenese und Autophagie für die Steigerung der funktionellen mitochondrialen Biomasse in cHL-Zellen verantwortlich sein könnte.

4.6. Relevanz der gesteigerten mitochondrialen Biomasse für die Tumorentstehung

Auch wenn die Mechanismen der Steigerung der mitochondrialen Biomasse ein wenig genauer beleuchtet werden konnten, bleibt die Frage ungeklärt, warum cHL-Zellen, welche aus B-Vorläuferzellen aus dem Keimzentrum abstammen, einen solch umständlich erscheinenden Mechanismus nutzen, um ihre mitochondriale Biomasse zu erhöhen und warum dies eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt.

Die verschiedenen metabolischen Anforderungen an B-Zellen in ihrer Reifung konnten zuletzt genauer charakterisiert werden: B-Zellen entwickeln sich von sich langsam teilenden pro-B-

Zellen im Knochenmark über Keimzentrumszellen in der Milz letztlich zu reifen und hoch anabolen, antikörperproduzierenden Plasmazellen und unterliegen in dieser Entwicklung deutlich unterschiedlichen metabolischen Anforderungen. All diese Zellreifungsstufen haben sehr verschiedene Sauerstoffangebote in ihrem jeweiligen Mikromilieu.⁷⁰ Interessanterweise zeigte sich in der natürlichen Reifung der B-Zellen eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität, während eine künstlich induzierte (beispielsweise durch LPS-getriggerte) Reifung in vitro zu einer Zunahme der mitochondrialen Aktivität führte.⁷⁰⁻⁷² B-Zellen können ihre mitochondrialen Funktionen also auf jeden Fall an verschiedene Anforderungen anpassen. Zusätzlich gilt es, den hohen Energiebedarf reifer Plasmazellen zur Antikörperproduktion nicht zu unterschätzen. Daher wäre eine denkbare Hypothese, dass HRS-Zellen nicht auf vorhandene Mechanismen und Signalwege zurückgreifen können, sondern für ihre massive Proliferation eine gesteigerte mitochondriale Biomasse benötigen, welche sie beim Vorhandensein von milden mtDNA Mutationen über retrograde Signalwege gut ermöglichen können. Birkenmeier et al beschreiben, dass eine Stimulation des NF-KappaB-Signalweges in den von uns untersuchten HRS-Zellen vorliegt, was einen möglichen Erklärungsansatz bieten könnte. Offen bleibt, welche pathomechanistische Rolle reaktive Sauerstoffspezies hierbei spielen könnten. Mitochondrien sind traditionell eher für ihre katabolen Funktionen bekannt. Die anabolen mitochondrialen Funktionen wiederum scheinen für schnell wachsende Tumorzellen von besonderer Bedeutung zu sein. Hierüber können genügend Bausteine wie Aminosäuren und Glutamin für die Nukleotid- und Proteinbiosynthese sowie für die Generierung von Membranlipiden in diesen sich schnell teilenden Zellen für die neuen Zellen bereit gehalten werden.^{39,73} Diese Ansprüche scheinen durch die beobachtete Steigerung der mitochondrialen Biomasse in den L428 Zellen, welche sich durch die beschriebenen Mechanismen ergibt, besonders gut abgedeckt.

4.7. Ausblick

Unsere Daten stützen die Theorie, dass die in den L428 Zellen gefundene mtDNA Mutation m.1782G>A die Translation von mtDNA kodierten Genen blockiert. Damit ist sie eine der mtDNA Mutationen deren Pathomechanismus verstanden ist. Sie bietet sich daher für die weitere Aufarbeitung der mitochondrialen Translation und ihrer Regulation an, insbesondere da bisher nicht geklärt ist auf welcher Ebene der Einfluss auf die Translation erfolgt. Es bleibt zu untersuchen ob sich als Folge der Mutation ein Problem beim Aufbau der mitoribosomalen Partikel einstellt oder die mitochondriale Translation gestört ist oder sogar beide Vorgänge beeinflusst werden. Interessanterweise ist die Position m.1782G an der Stabilisierung der rRNA beteiligt, da sie entfernte Regionen der 16S-rRNA zusammenbringt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Faltung des Moleküls betroffen ist, wobei die genauen Mechanismen hierbei Inhalt weiterer Forschungsvorhaben sein werden. Ebenso könnten die

von uns generierten Knockoutzellen L428NDUFV2 sehr gut für eine weitere Untersuchung der Interaktion zwischen dem Nukleus und dem mitochondrialen Netzwerk verwendet werden, da diese Zellen eine gesteigerte Transkription auch nukleär-kodierter mitochondrialer Gene aufwiesen. Der genaue Pathomechanismus inklusive der Signalwege ist auch hier bisher nicht bekannt.

Mutationen in der mtDNA kommen in cHL-Zellen vor und spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Mitochondriale Mutationen führen, wenn sie nicht zu schwerwiegend sind, nicht zu einer Abnahme der mitochondrialen Atmungskettenfunktion. In cHL Zellen mit Mutation der mtDNA ist eine Zunahme der mitochondrialen Atmung und der mitochondrialen Biomasse nachweisbar. Hierbei scheinen retrograde Signalwege zu einer Steigerung der Expression von mtDNA-kodierten Genen zu führen während ein an die Bedürfnisse der Tumorzellen optimal angepasstes metabolisches Setting entsteht. Sind die mtDNA Mutationen schwerwiegender, scheinen andere Signalwege einzugreifen und die Vorteile für die Tumorzellen nicht mehr über eine gesteigerte mitochondriale Biomasse erklärbar zu sein. Zusammenfassend können wir hier einen kleinen Baustein auf dem Weg zum Verständnis der komplexen metabolischen Veränderungen von Tumorzellen liefern. Diese Veränderungen sind in jedem Fall vielfältig und je nach Gegebenheiten und Tumorentität sehr differenziert zu betrachten.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 2012; **122**: 3439–47.
- 2 Classics in oncology. Excerpts from: On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen, Thomas Hodgkin. *CA Cancer J Clin* 1973; **23**: 54–60.
- 3 Huang J, Pang WS, Lok V, *et al.* Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: a global data analysis. *J Hematol Oncol* 2022; **15**: 57.
- 4 Punnett A, Tsang RW, Hodgson DC. Hodgkin Lymphoma Across the Age Spectrum: Epidemiology, Therapy, and Late Effects. *Seminars in Radiation Oncology* 2010; **20**: 30–44.
- 5 Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 15–27.
- 6 Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, *et al.* Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10962–6.
- 7 Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 1996; **184**: 1495–505.

- 8 Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* 2000; **95**: 3020–4.
- 9 Emmerich F, Meiser M, Hummel M, *et al.* Overexpression of I Kappa B Alpha Without Inhibition of NF- κ B Activity and Mutations in the I Kappa B Alpha Gene in Reed-Sternberg Cells. *Blood* 1999; **94**: 3129–34.
- 10 Weniger MA, Melzner I, Menz CK, *et al.* Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 2006; **25**: 2679–84.
- 11 Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, *et al.* Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 2006; **108**: 2280–9.
- 12 Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, *et al.* PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008; **111**: 3220–4.
- 13 Cader FZ, Schackmann RCJ, Hu X, *et al.* Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4+ regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. *Blood* 2018; **132**: 825–36.
- 14 Bröckelmann PJ, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. *Semin Hematol* 2016; **53**: 155–64.
- 15 Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, *et al.* Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 2125–32.
- 16 Younes A, Santoro A, Shipp M, *et al.* Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 1283–94.
- 17 Sasse S, Bröckelmann PJ, Goergen H, *et al.* Long-Term Follow-Up of Contemporary Treatment in Early-Stage Hodgkin Lymphoma: Updated Analyses of the German Hodgkin Study Group HD7, HD8, HD10, and HD11 Trials. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 1999–2007.
- 18 Li C, Liu F-Y, Shen Y, Tian Y, Han F-J. Research progress on the mechanism of glycolysis in ovarian cancer. *Front Immunol* 2023; **14**: 1284853.
- 19 Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022; **23**: 141–61.
- 20 Zhu J, Vinothkumar KR, Hirst J. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature* 2016; **536**: 354–8.
- 21 Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MW, *et al.* Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* 1985; **314**: 592–7.
- 22 Chomyn A, Cleeter MW, Ragan CI, Riley M, Doolittle RF, Attardi G. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* 1986; **234**: 614–8.

- 23 Stroud DA, Surgenor EE, Formosa LE, *et al.* Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* 2016; **538**: 123–6.
- 24 Rasheed MRHA, Tarjan G. Succinate Dehydrogenase Complex: An Updated Review. *Arch Pathol Lab Med* 2018; **142**: 1564–70.
- 25 Xia D, Esser L, Tang W-K, *et al.* Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: implications to the mechanism of function. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1827**: 1278–94.
- 26 Yoshikawa S, Shimada A. Reaction mechanism of cytochrome c oxidase. *Chem Rev* 2015; **115**: 1936–89.
- 27 Timón-Gómez A, Nývltová E, Abriata LA, Vila AJ, Hosler J, Barrientos A. Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Semin Cell Dev Biol* 2018; **76**: 163–78.
- 28 Abbas YM, Wu D, Bueler SA, Robinson CV, Rubinstein JL. Structure of V-ATPase from the mammalian brain. *Science* 2020; **367**: 1240–6.
- 29 Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson N-G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 2016; **85**: 133–60.
- 30 Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 1998; **18**: 231–6.
- 31 Kopinski PK, Singh LN, Zhang S, Lott MT, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2021; **21**: 431–45.
- 32 Hällberg BM, Larsson N-G. Making proteins in the powerhouse. *Cell Metab* 2014; **20**: 226–40.
- 33 Kukat C, Davies KM, Wurm CA, *et al.* Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: 11288–93.
- 34 Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 1354–66.
- 35 Wu Z, Puigserver P, Andersson U, *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; **98**: 115–24.
- 36 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–74.
- 37 Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 1927; **8**: 519–30.
- 38 Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123**: 309–14.
- 39 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; **324**: 1029–33.
- 40 Kim H-S, Patel K, Muldoon-Jacobs K, *et al.* SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* 2010; **17**: 41–52.

- 41 Kloosterhof NK, Bralten LBC, Dubbink HJ, French PJ, van den Bent MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol* 2011; **12**: 83–91.
- 42 Lussey-Lepoutre C, Hollinshead KER, Ludwig C, *et al.* Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism. *Nat Commun* 2015; **6**: 8784.
- 43 Cormio A, Guerra F, Cormio G, *et al.* Mitochondrial DNA content and mass increase in progression from normal to hyperplastic to cancer endometrium. *BMC Res Notes* 2012; **5**: 279.
- 44 LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, *et al.* PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; **16**: 992–1003, 1–15.
- 45 Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, *et al.* Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the 'reverse Warburg effect' in positive lymph node tissue. *Cell Cycle* 2012; **11**: 1445–54.
- 46 Huebbers CU, Adam AC, Preuss SF, *et al.* High glucose uptake unexpectedly is accompanied by high levels of the mitochondrial β -F1-ATPase subunit in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2015; **6**: 36172–84.
- 47 Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 685–98.
- 48 Stewart JB, Alaei-Mahabadi B, Sabarinathan R, *et al.* Simultaneous DNA and RNA Mapping of Somatic Mitochondrial Mutations across Diverse Human Cancers. *PLoS Genet* 2015; **11**: e1005333.
- 49 Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, *et al.* Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife* 2014; **3**: e02935.
- 50 Tan AS, Baty JW, Dong L-F, *et al.* Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab* 2015; **21**: 81–94.
- 51 Salas A, García-Magariños M, Logan I, Bandelt H-J. The saga of the many studies wrongly associating mitochondrial DNA with breast cancer. *BMC Cancer* 2014; **14**: 659.
- 52 Birkenmeier K, Dröse S, Wittig I, *et al.* Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma are highly dependent on oxidative phosphorylation. *Int J Cancer* 2016; **138**: 2231–46.
- 53 Pereira L, Soares P, Máximo V, Samuels DC. Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncocytic phenotype: pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors. *BMC Cancer* 2012; **12**: 53.
- 54 Greaves LC, Elson JL, Nooteboom M, *et al.* Comparison of mitochondrial mutation spectra in ageing human colonic epithelium and disease: absence of evidence for purifying selection in somatic mitochondrial DNA point mutations. *PLoS Genet* 2012; **8**: e1003082.
- 55 Gekeler J, Zsurka G, Kunz WS, *et al.* Clonal expansion of different mtDNA variants without selective advantage in solid tumors. *Mutat Res* 2009; **662**: 28–32.

- 56 Elson JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF. Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 802–6.
- 57 Picard M, Zhang J, Hancock S, *et al.* Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: E4033–4042.
- 58 Gardeitchik T, Mohamed M, Ruzzenente B, *et al.* Bi-allelic Mutations in the Mitochondrial Ribosomal Protein MRPS2 Cause Sensorineural Hearing Loss, Hypoglycemia, and Multiple OXPHOS Complex Deficiencies. *Am J Hum Genet* 2018; **102**: 685–95.
- 59 Smits P, Saada A, Wortmann SB, *et al.* Mutation in mitochondrial ribosomal protein MRPS22 leads to Cornelia de Lange-like phenotype, brain abnormalities and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2011; **19**: 394–9.
- 60 Lake NJ, Webb BD, Stroud DA, *et al.* Biallelic Mutations in MRPS34 Lead to Instability of the Small Mitochondrial Subunit and Leigh Syndrome. *Am J Hum Genet* 2018; **102**: 713.
- 61 Miller C, Saada A, Shaul N, *et al.* Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol* 2004; **56**: 734–8.
- 62 Richter R, Rorbach J, Pajak A, *et al.* A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *EMBO J* 2010; **29**: 1116–25.
- 63 Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1787–93.
- 64 Liu Z, Butow RA. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 2006; **40**: 159–85.
- 65 Durieux J, Wolff S, Dillin A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* 2011; **144**: 79–91.
- 66 DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003; **348**: 2656–68.
- 67 Richter-Dennerlein R, Oeljeklaus S, Lorenzi I, *et al.* Mitochondrial Protein Synthesis Adapts to Influx of Nuclear-Encoded Protein. *Cell* 2016; **167**: 471–483.e10.
- 68 Valenzuela S, Zhu X, Macao B, *et al.* Small molecules restore mutant mitochondrial DNA polymerase activity. *Nature* 2025; **642**: 501–7.
- 69 Birkenmeier K, Moll K, Newrzela S, Hartmann S, Dröse S, Hansmann M-L. Basal autophagy is pivotal for Hodgkin and Reed-Sternberg cells' survival and growth revealing a new strategy for Hodgkin lymphoma treatment. *Oncotarget* 2016; **7**: 46579–88.
- 70 Stein M, Dütting S, Mougiakakos D, *et al.* A defined metabolic state in pre B cells governs B-cell development and is counterbalanced by Swiprosin-2/EFhd1. *Cell Death Differ* 2017; **24**: 1239–52.
- 71 Urbanczyk S, Stein M, Schuh W, Jäck H-M, Mougiakakos D, Mielenz D. Regulation of Energy Metabolism during Early B Lymphocyte Development. *Int J Mol Sci* 2018; **19**: 2192.

- 72 Caro-Maldonado A, Wang R, Nichols AG, *et al.* Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J Immunol* 2014; **192**: 3626–36.
- 73 Zhang J, Pavlova NN, Thompson CB. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *The EMBO Journal* 2017; **36**: 1302–15.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Glykolyse	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Elektronenflusses	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur der mitochondrialen DNA	14