

Über die funktionelle Entleerung, den Feinbau und die Entwicklung von Tumor-Mitochondrien*

Von NORBERT WEISSENFELS

Aus dem Zoologischen Institut und dem Zentral-Laboratorium für Angewandte Übermikroskopie
am Zoologischen Institut der Universität Bonn
(Z. Naturforschg. 12 b, 168—171 [1957]; eingegangen am 13. Oktober 1956)

Nach WOHLFARTH-BOTTERMANN werden die Tubuli mitochondriales, die das wesentliche Struktur-element der Paramecien-Mitochondrien darstellen, bei erhöhtem Stoffwechsel von den Mitochondrien als geformte Sekrete in das Cytoplasma abgeschieden.

Die Mitochondrien von Tumorzellen (Sarkom und Carcinom), die sich ebenfalls sehr schnell vermehren, unterscheiden sich in zweifacher Hinsicht von den normalen Mitochondrien höherer Tiere: 1. Sie besitzen nur wenige Cristae und sind im Jugendstadium sehr dicht mit Tubuli angefüllt. 2. Die meisten in Tumorzellen enthaltenen Mitochondrien sind leer; sie haben ihren tubulären Inhalt an das Plasma abgegeben.

Die Cristae entstehen bei den jungen Mitochondrien aus der inneren der beiden Hüllmembranen und wachsen scheibenartig in den Innenraum hinein. Die Mitochondrien werden also durch die Cristae in mehr oder weniger vollständige Kammern aufgeteilt, die mit Tubuli angefüllt sind.

Die Entwicklung der Mitochondrien lässt sich von lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Promitochondrien ableiten, die eine doppelt konturierte Hülle besitzen und schon eine relativ dichte, aus Tubuli bestehende Grundsubstanz enthalten. Die Tubuli haben einen Durchmesser von 50—100 Å.

Der Feinbau der Mitochondrien wurde in letzter Zeit mehrfach beschrieben. Die elektronen-mikroskopischen Aufnahmen ergaben, daß die kugeligen bis schlauchförmigen Mitochondrien eine doppel-lamellige Hülle besitzen, die ein System ebenfalls doppelt konturierter Septen (Cristae mitochondriales) umschließt. Diese Untersuchungen wurden hauptsächlich an langsam sich vermehrenden Zellen von Warmblütern durchgeführt. Die Feinstrukturen der Mitochondrien interessieren deshalb so sehr, weil an ihnen die bekannten Mitochondrienfermente lokalisiert sein müssen. SJÖSTRAND¹, (1954).

Kürzlich berichtete WOHLFARTH-BOTTERMANN² (1956 a und b) über die Entwicklung der Mitochondrien bei Paramecien, die durch reichliche Ernährung zu einer raschen Teilungsfolge angeregt worden waren. Die Mitochondrien dieser Paramecien vermehrten sich ebenfalls schneller als normal, und so konnte der ganze — bisher unbekannte — Entwicklungs-gang der Mitochondrien mit Ausnahme ihrer Entstehung aufgeklärt werden. Diese Ergebnisse veranlaßten mich, das Verhalten der Mitochondrien ver-

schiedener Tumorzellen zu untersuchen, weil diese entarteten Zellen ja auch eine relativ rasche Teilungsfolge haben.

Material und Methode

Für diese Untersuchungen wurden zwei Mäusetumoren verwendet, ein Spindelzellensarkom (GN-Sarkom) und ein Mammacarcinom (dba-Carcinom), die beide im August 1954 bei einer GN- bzw. einer dba-Maus unserer Zuchten spontan aufgetreten sind und seitdem teils in Gewebekulturen gezogen, teils auf Tiere der Ausgangsrassen transplantiert werden.

Kleine Stücke von verschiedenen Tierpassagen wurden in einer isotonischen, auf pH 7,2 gepufferten Lösung von Osmiumtetroxyd (PALADE³, 1952 a und RHODIN⁴ 1954) bei 0°C fixiert und 4 Std. lang mit 1-proz. Phosphorwolframsäure (WOHLFARTH-BOTTERMANN⁵ 1956 c) nachimprägniert. Die in der Alkoholreihe entwässerten Präparate wurden in einem Gemisch von gereinigtem Methyl- und Butylmetacrylat eingebettet. Hierzu wurden mit dem Sjöstrand-Mikrotom ultradünne Schnitte angefertigt. Die elektronenoptischen Aufnahmen machte Herr Dr. WOHLFARTH-BOTTERMANN mit dem Siemens Übermikroskop 100 d.

* Vortrag der First European Regional Conference on Electron Microscopy, Stockholm 1956.

¹ F. S. SJÖSTRAND, The ultrastructure of mitochondria. Symposium on „Fine Structure of Cells“, Leiden 1954.

² K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, Z. Naturforschg. 11 b, 578 [1956]; Verh. d. dtsch. Zool. Ges. 1956 in Hamburg (1956 b).

³ G. E. PALADE, J. exp. Medicine 95, 285 [1952 a].

⁴ J. RHODIN, Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Dissertation, Stockholm 1954.

⁵ K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, Die Eignung und Anwendung von Phosphorwolframsäure und Thalliumnitrat als Kontrastmittel zur Darstellung cytoplasmatischer Strukturen. First European regional conference on electron microscopy. Stockholm 1956 c.

Ergebnisse

a) Die Entleerung der Tumor-Mitochondrien

Viele Mitochondrien des GN-Sarkoms und des dba-Carcinoms erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild weitgehend leer. Sie besitzen zwar noch ihre doppelamellige Hülle und auch die charakteristischen Cristae, aber die normalerweise zwischen diesen liegende Grundsubstanz, die SJÖSTRAND⁶ 1954 als „Granulation“ bezeichnete, ist bei ihnen häufig nur noch teilweise oder gar nicht mehr vorhanden. Auf Abb. 1* (GN-Sarkom) erkennt man rechts im Bild zwei Mitochondrien, deren Grundsubstanz in zwei engbegrenzten Bezirken fehlt. Die Mitochondrien liegen in dieser Zelle in der Nähe eines ausgelappten Kernes, von dem man oben im Bild noch zwei kleine Ausschnitte sieht. Die beiden Mitochondrien in Abb. 2 (GN-Sarkom) besitzen dagegen nur noch Reste der Grundsubstanz, die an der Hülle und den Cristae anhaften. Die bisher übliche Fixierung mit Osmiumtetroxyd (Abb. 1) lieferte nur einen schwachen Kontrast. Dieser konnte aber durch eine Nachimprägnierung mit Phosphorwolframsäure so stark erhöht werden (Abb. 2 und folgende), daß die Struktur der Mitochondrien-Grundsubstanz erkennbar wurde. Hiervon soll jedoch erst später die Rede sein. In Abb. 2 erkennt man außerdem noch einfach konturierte dünne Zellausläufer, die von zwei benachbart liegenden Sarkomzellen stammen und wechselseitig ineinandergreifen.

Abb. 3 stellt Ausschnitte einiger dba-Carcinomzellen dar. Oben und rechts unten in der Abbildung liegen in Zellausschnitten mit relativ dichtem Plasma mehrere Mitochondrien, die so gut wie keine Grundsubstanz enthalten. Ihre Cristae sind hier nicht sichtbar, weil die Schnittrichtung wahrscheinlich parallel zu ihnen, nämlich in der Mitochondrien-Querrichtung verläuft. Links in der Abbildung erkennt man mehrere volle Mitochondrien, die aber in einer Zelle mit weniger dichtem Plasma liegen. Das Mitochondrium in der linken oberen Ecke wurde längs geschnitten, so daß seine Cristae quergetroffen und folglich sichtbar wurden. Auffallend ist also, daß die hier abgebildeten, benachbart liegenden Carcinomzellen entweder dichtes Plasma mit leeren oder weniger dichtetes Plasma mit vollen Mitochondrien enthalten.

Links in der Abb. 3 erkennt man außerdem ringförmig angeordnete Membranpaare und in ihrer Nähe einfach konturierte Cytoplasmabläschchen. SJÖSTRAND und HANZON (1954) und HAGUENAU und BERNHARD⁷ (1955) sind der Ansicht, daß der Golgiapparat eine solche Struktur besitzt.

Abb. 4 stellt Ausschnitte von zwei Carcinomzellen dar. Ein kleines Stück der doppelamelligen Zellmembran verläuft quer durch das ganze Bild von links unten nach rechts oben. Links oben erkennt man einen Kernabschnitt und unten ein für Tumorgewebe charakteristisches Mitochondrium. Viele Tumor-Mitochondrien enthalten nämlich nur wenige Cristae, die sich durch den ganzen Innenraum erstrecken (das in Abb. 4 sogar nur eine); andere scheinen unvollständig ausgebildet zu sein. Außerdem sind nur relativ wenige Mitochondrien vollständig mit Grundsubstanz angefüllt. Viele von ihnen besitzen, wie in Abb. 4, nur einen dünnen Belag hiervon auf der Innenseite ihrer Hüllmembran oder haben gar keine Grundsubstanz.

Bisher liegen über 300 elektronenmikroskopische Aufnahmen von diesen beiden Tumoren vor. Nach deren Auswertung scheint es sicher zu sein, daß die Tumor-Mitochondrien ihre Grundsubstanz durch Öffnungen in der Hüllmembran an das sie umgebende Plasma abgeben. Ein Fixierungs-Artefakt liegt nicht vor, denn in Abb. 3 liegen volle und leere Mitochondrien in einem Präparat nebeneinander. Außerdem ist das gegen schlechte Fixierung sehr empfindliche Plasma gut erhalten.

Abb. 5 stellt ein offenes Mitochondrium in der Randzone einer GN-Sarkomzelle dar, und in Abb. 13 erkennt man ein Mitochondrium des dba-Carcinoms, dessen Hüllmembran an der Oberseite aufgelöst ist. WOHLFARTH-BOTTERMANN² (1956 b) konnte ebenfalls Mitochondrien-Öffnungen bei Paramecien und sogar den Austritt von relativ großen, tubulären Strukturen aus den Mitochondrien in das Plasma hinein eindeutig nachweisen. Bei den Tumor-Mitochondrien kann man dagegen die ausgetretene Mitochondrien-Grundsubstanz nur sehr schwer direkt im Plasma wiedererkennen. Es handelt sich hierbei um extrem kleine Strukturen (50–100 Å), die sich elektronenmikroskopisch zur Zeit nur an ganz dünnen Schnitten und bei bester Fokussierung darstellen lassen. Bei der Besprechung der Mitochondrien-Entwicklung

⁶ F. S. SJÖSTRAND u. V. HANZON, Experientia [Basel] **10**, 367 [1954].

* Abb. 1—13 s. Tafel S. 170 a, b, c u. d.

⁷ F. HAGUENAU u. W. BERNHARD, Arch. Anat. microsc. et Exp. **44**, 27 [1955].

werde ich auf diese Strukturen ausführlicher eingehen.

b) Der Feinbau der Mitochondrien

SJÖSTRAND und RHODIN⁸ beschrieben 1952 die Feinstruktur der Mitochondrien. Nach ihrer Darstellung sollen die Cristae mitochondriales keine Abkömmlinge der Mitochondrienhülle sein, sondern selbständige, scheibchenartige Gebilde innerhalb der Mitochondrien, die quer zu deren Längsachse in kurzen Abständen hintereinander stehen. Da aber die Tumor-Mitochondrien bei der Abgabe ihrer Grundsubstanz die Cristae behalten, konnte mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, daß die vermeintlich selbständigen Innenscheiben in Wirklichkeit mit der Hülle verbunden sind. In mehreren Fällen (Abb. 6, dba-Carcinom und Abb. 7 GN-Sarkom) ließ sich nun eindeutig zeigen, daß die Cristae von dem Innenblatt der Mitochondrien-Hülle abstammen. Kürzlich kamen übrigens HOWATSON und HAM⁹ (1955) zu dem gleichen Resultat. Damit bewahrheitet sich also die Auffassung von PALADE¹⁰ (1952 b), der die charakteristischen Mitochondrien-Innenstrukturen Cristae mitochondriales nannte, weil er sie für Falten der Mitochondrium-Hülle hielt.

Die Cristae stellen teils zarte Ringwülste des inneren Hüllblattes dar, also kurze Wandvorsprünge, andere wachsen lamellenartig von der einen Mitochondrien-Seite quer durch das Lumen hindurch bis zur gegenüberliegenden Wand (Abb. 8, dba-Carcinom). Ob die freien Enden dieser Cristae sich dort nur an die Mitochondrium-Hülle anlegen oder fest mit ihr verwachsen können, ist noch unentschieden. Die Einschnürung des Mitochondriums in Abb. 4 weist darauf hin, daß hier Cristae und Hüllmembran fest miteinander verbunden sind.

Die Mitochondrien in Abb. 8 haben wieder auffallend helle Innenbereiche; sie besitzen also nicht mehr ihre gesamte Grundsubstanz.

Die Mitochondrien sind nicht immer kugelig bis stäbchenförmig, sondern verzweigen sich auch manchmal. An diesen Stellen sind ihre Cristae unregelmäßig angeordnet und bestehen häufig auch nicht aus einfachen, sondern aus gegabelten Lamellen, wie man auf Abb. 9 (dba-Carcinom) an zwei Stellen deutlich erkennen kann. Diese nur ausschnittsweise abgebildete Verzweigungsstelle eines Mitochondriums enthält besonders viele Cristae.

⁸ F. S. SJÖSTRAND u. J. RHODIN, Exp. Cell Res. **4**, 426 [1952].

⁹ A. F. HOWATSON u. A. W. HAM, Cancer Res. **15**, 62 [1955].

c) Die Entwicklung der Mitochondrien

Die Entwicklung der Mitochondrien untersuchte ich zunächst an Gewebekulturen der beiden Tumoren. Junge Tumorzellen besitzen zunächst in einer bestimmten Region des kernnahen Plasmas kleine kugelige, nur sehr schwach erkennbare Mitochondrien. Diese werden rasch größer und wachsen zu fädigen Gebilden heran, die häufig länger sind als der Zellkern (vgl. BRÄM¹¹, 1951). Elektronenmikroskopisch erkennt man außerdem ganz kleine, also vermutlich sehr junge Mitochondrien, die lichtoptisch unsichtbar sind. Diese Promitochondrien besitzen noch keine Cristae, enthalten aber eine strukturierte Grundsubstanz, die dichter ist als das sie umgebende Plasma (Abb. 10 und 11, dba-Carcinom). In der Grundsubstanz sind viele runde Anschnitte sichtbar, woraus man schließen kann, daß es sich hierbei wahrscheinlich um Tubuli handelt. Den Größenunterschied zwischen den Cristae und den Tubuli erkennt man sehr gut in Abb. 12 (GN-Sarkom). Dort liegt ein Mitochondrium mit einer Crista (oben) dicht neben einem Promitochondrium (unten), das nur Tubuli enthält. Die Tubuli sind also bedeutend kleiner als die Cristae und liegen an der Grenze der Auflösbarkeit für die derzeitigen Übermikroskope. In bestimmten Plasmaregionen vieler dba-Carcinomzellen (Abb. 3 links oben und Abb. 10 rechts) trifft man außerdem noch doppelt konturierte Partikel an, die einen Durchmesser von 500 bis 600 Å haben. Ihre Hülle ist ungefähr 100 Å dick. Ob es sich hierbei um Viren handelt, oder ob diese Körperchen extrem kleine Mitochondrien sind, kann noch nicht entschieden werden.

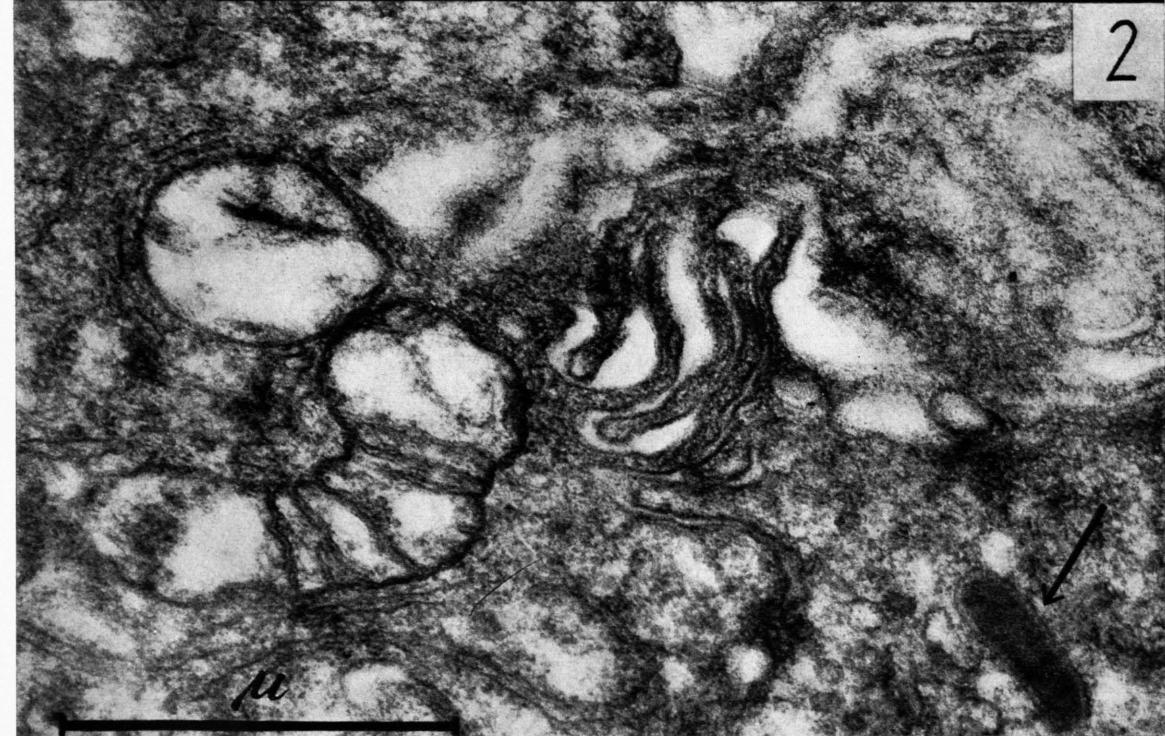
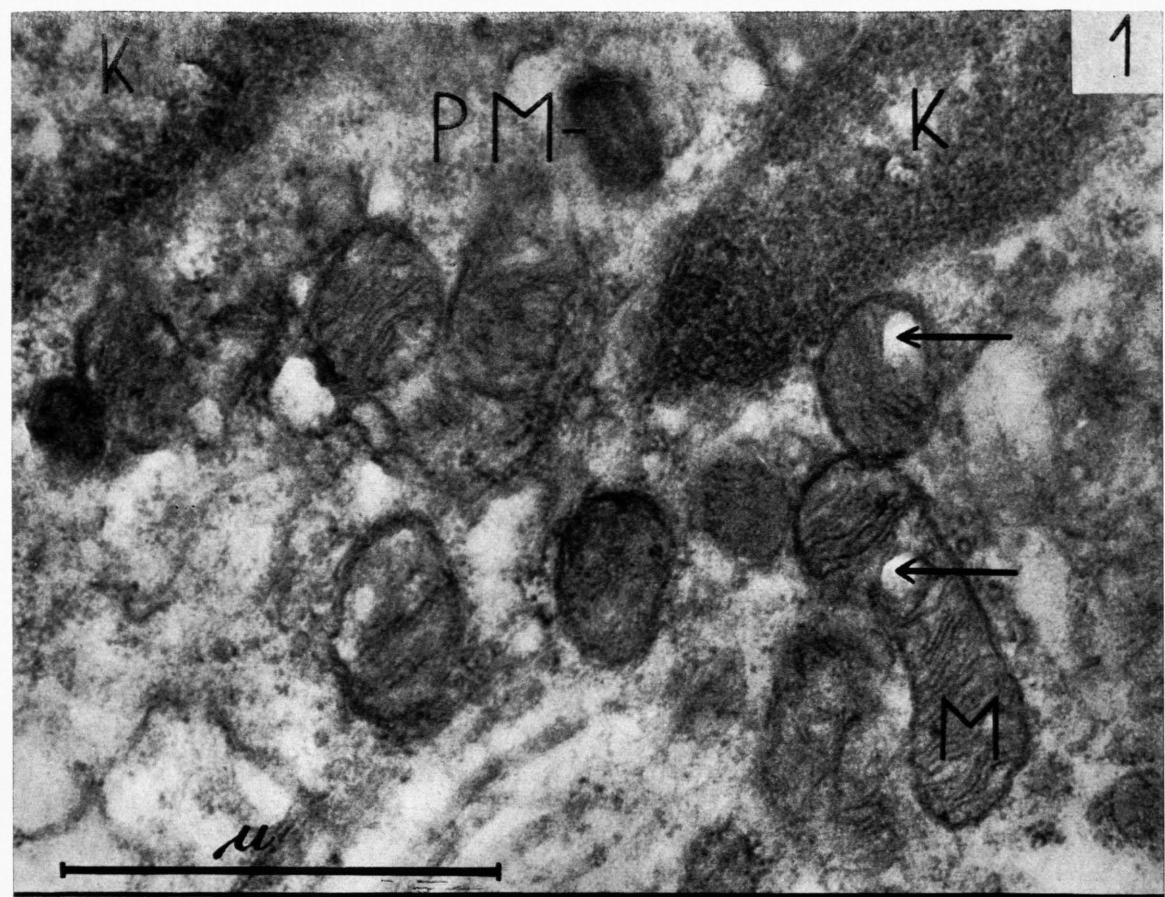
In Abb. 13 sieht man schließlich neben drei mehr oder weniger leeren Mitochondrien ein relativ großes Promitochondrium. Dieses, so wie alle anderen Promitochondrien (Abb. 1, 2 und 4), sind so dicht mit der tubulären Grundsubstanz gefüllt, daß sie in den Abbildungen sofort ins Auge fallen.

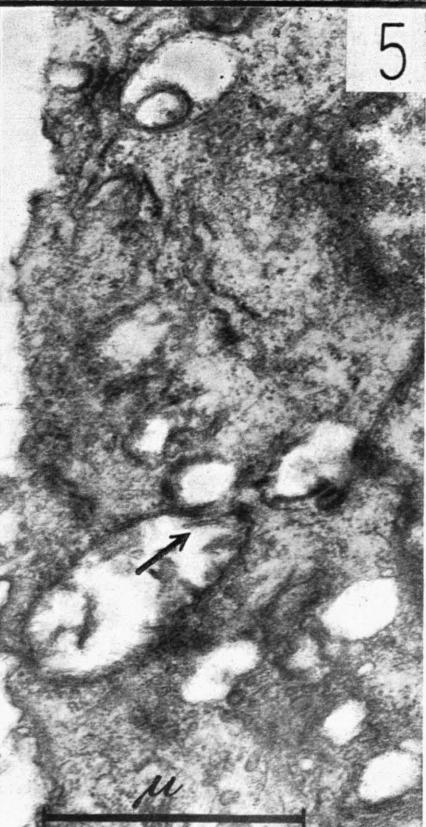
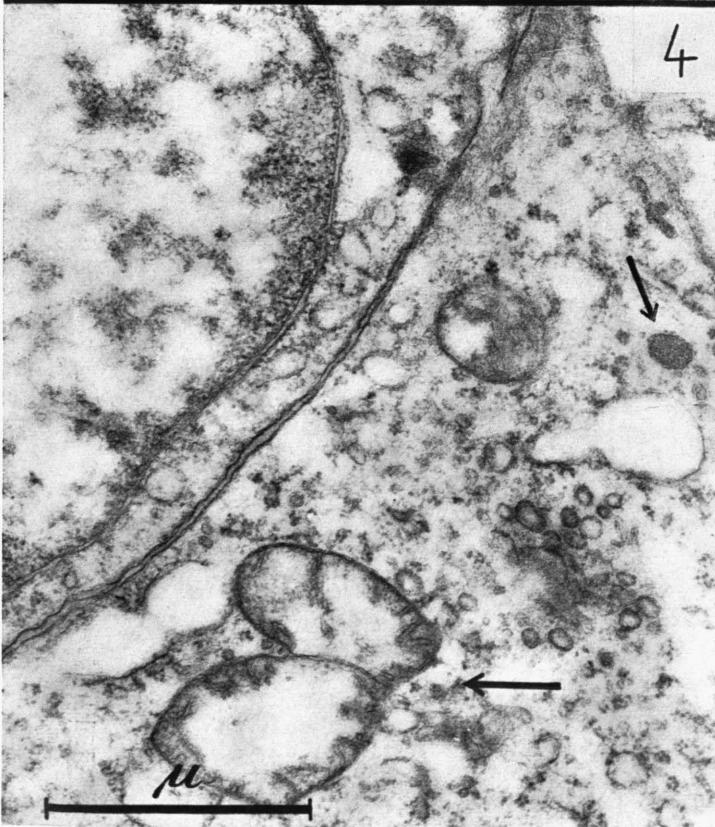
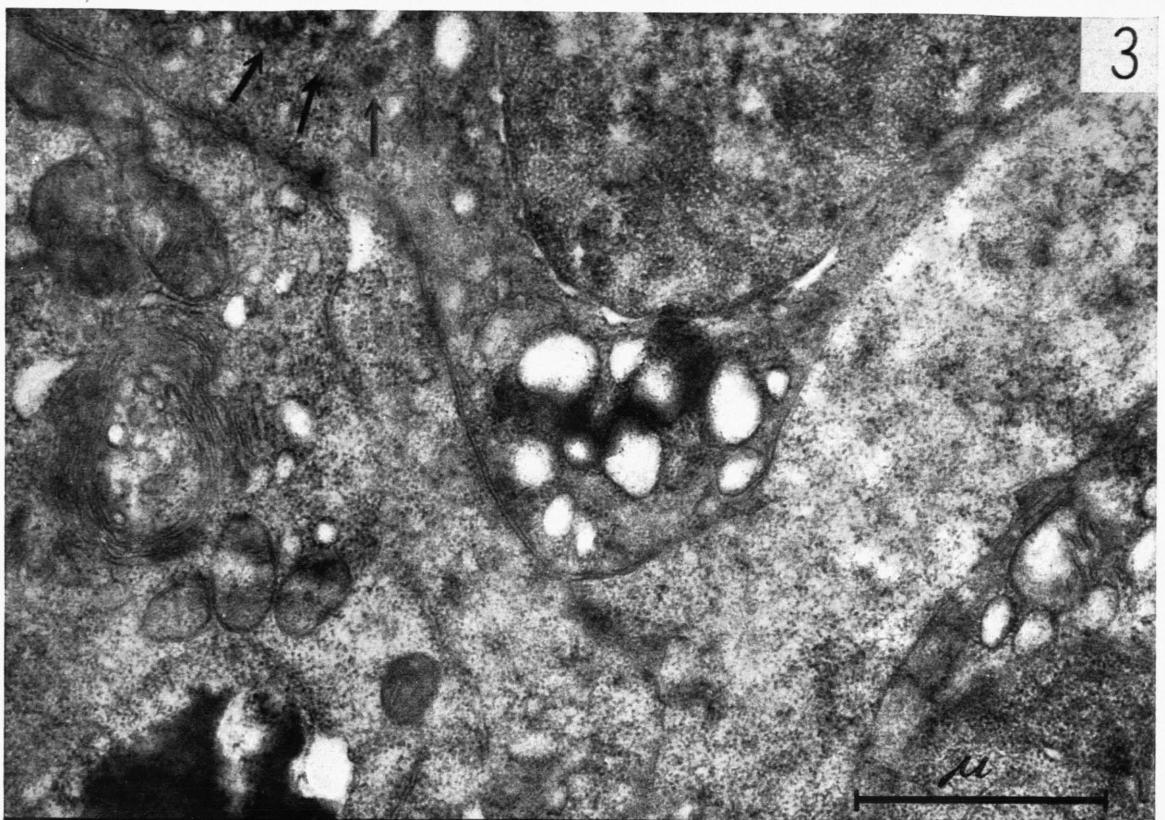
In einem späteren Entwicklungsstadium entstehen, wie gesagt, aus Ringwülsten des inneren Hüllblattes die Cristae mitochondriales. Diese gliedern die Mitochondrien in hintereinander-liegende, meist nicht ganz verschlossene Kammern und teilen dabei gleichzeitig die Grundsubstanz auf.

Die Mitochondrien schließen möglicherweise mit der Entleerung ihre Entwicklung ab. Ob ein Ver-

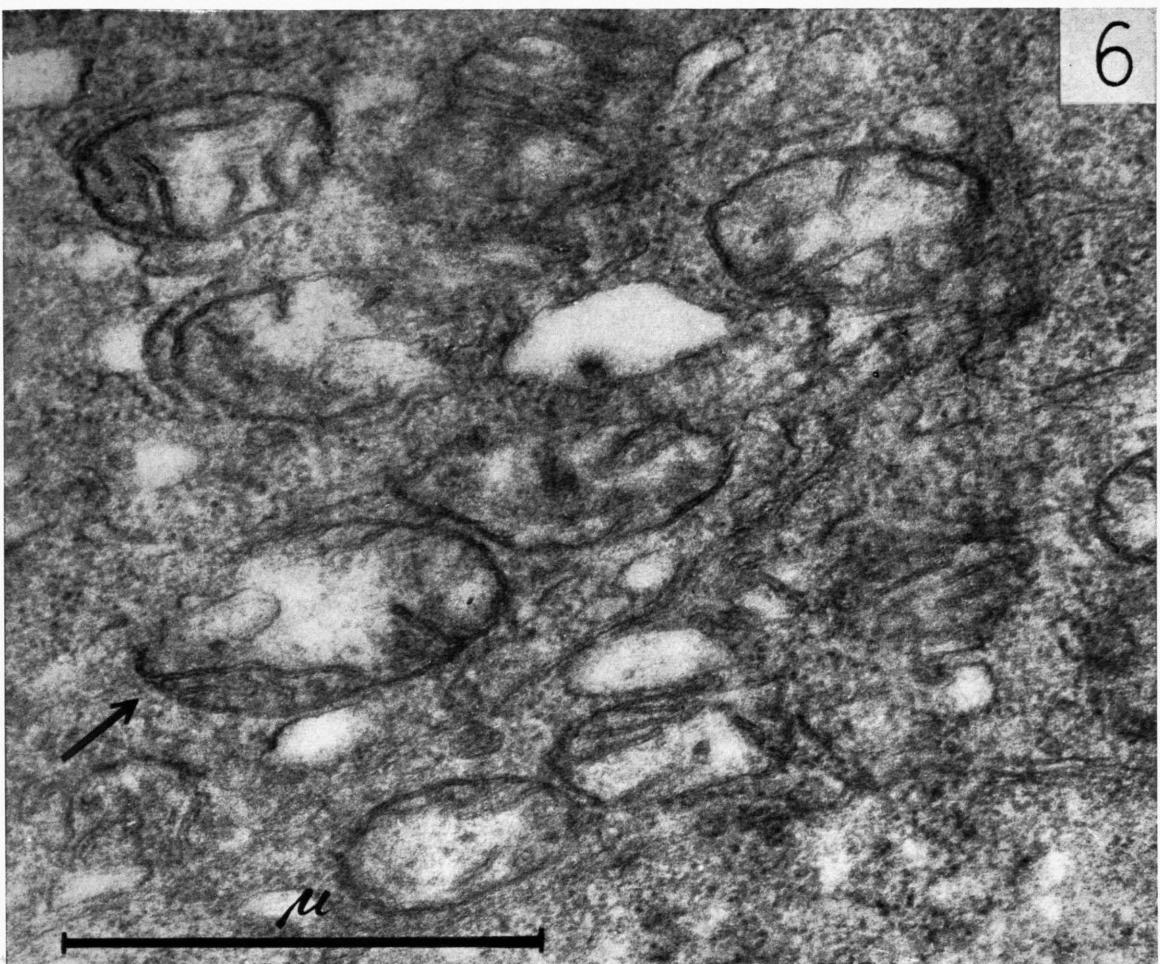
¹⁰ G. E. PALADE, Anatom. Rec. **114**, 427 [1952 b].

¹¹ A. BRÄM, Acta anatom. [Basel] **13**, 385 [1951].





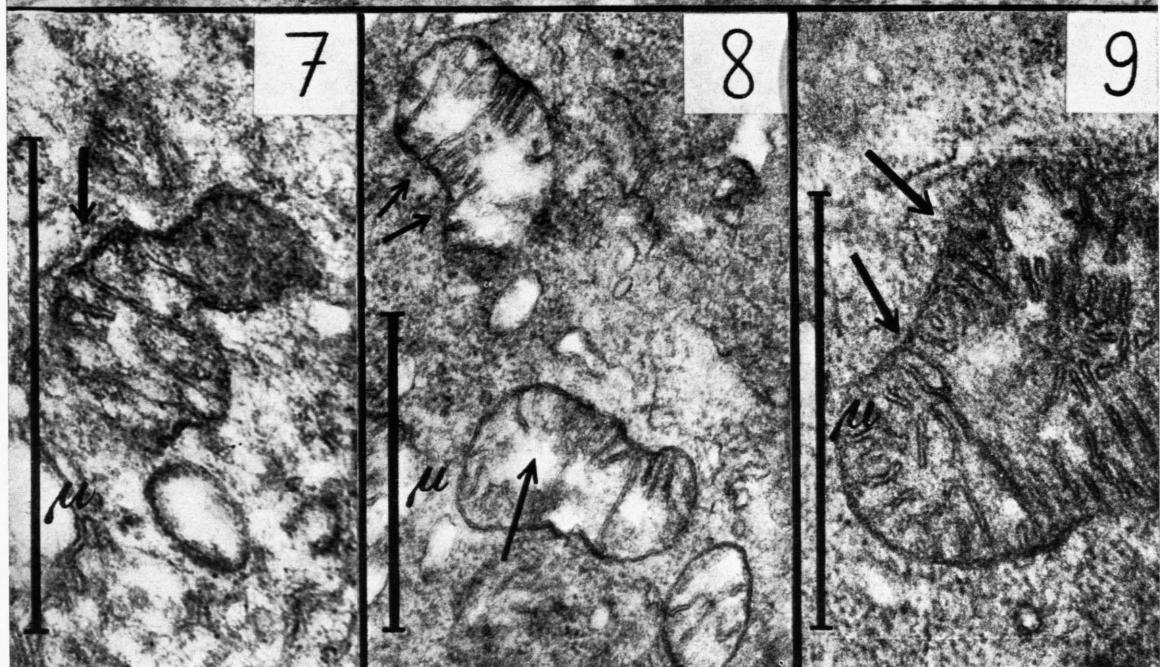
6

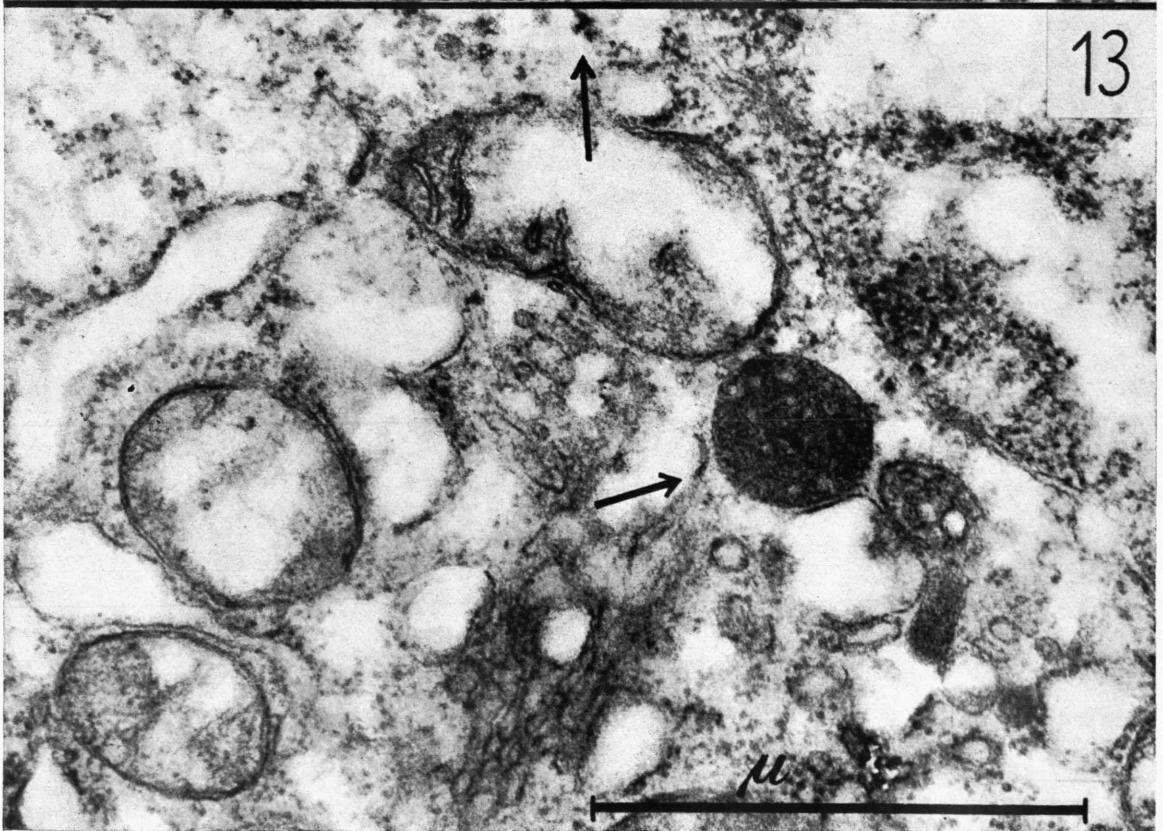
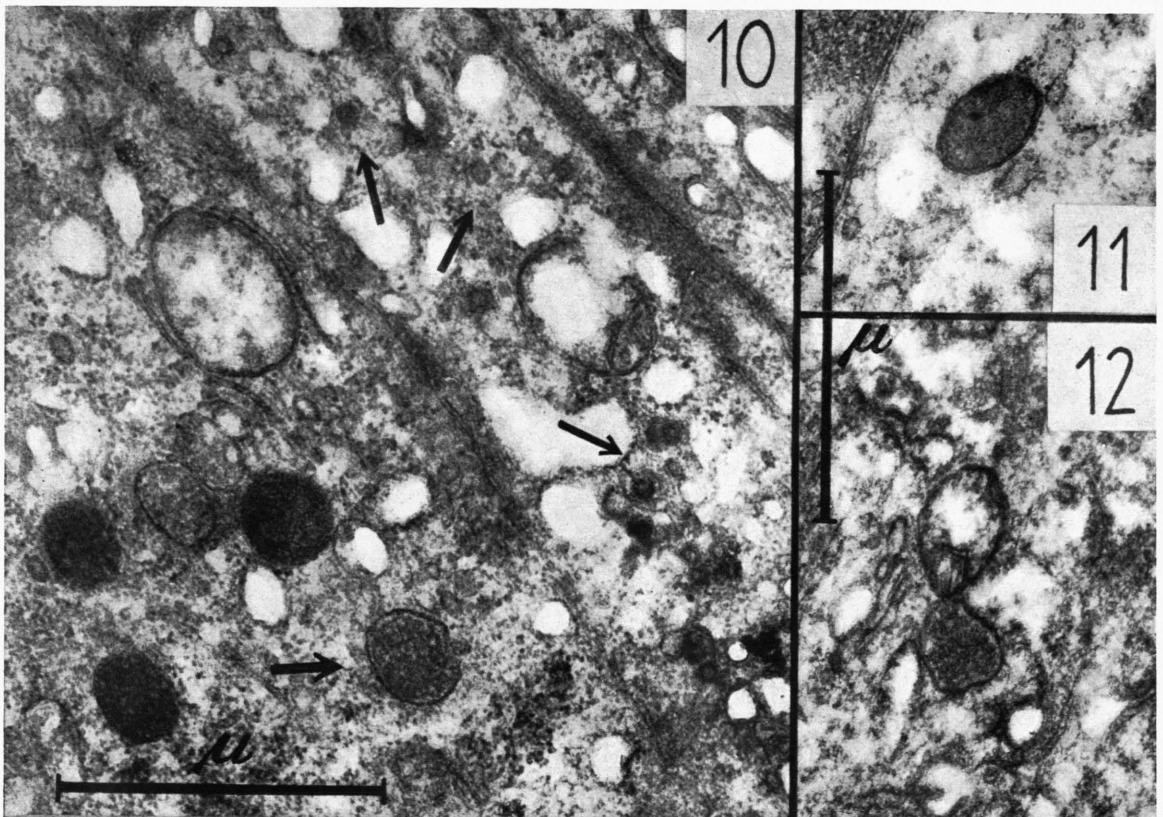


7

8

9





schluß der Wandöffnungen und eine Regeneration der Tubuli über Mikrotubuli noch einmal möglich ist, so wie es WOHLFARTH-BOTTERMANN² (1956 b) für die Paramecien-Mitochondrien berichtete, kann wegen der Kleinheit dieser Strukturen für die Tumor-Mitochondrien nicht entschieden werden.

Die Entleerung der Mitochondrien ist, wie an dem Paramecien-Beispiel gezeigt werden konnte, keine Eigenart der Tumorzellen, sondern erfolgt wahrscheinlich bei allen Zellen, die eine *beschleunigte Teilungsfolge* haben. GIESEKING¹² (1954), ferner ROUILLER, HAGUENAU, GOLDE und LACOUR¹³ (1956) bildeten ebenfalls leere Mitochondrien ab, gaben für diese Erscheinung jedoch keine Deutung.

Die vorliegenden Ergebnisse reichen meiner Meinung nach aus, um die Entleerung der Mitochondrien als einen funktionellen Vorgang bezeichnen zu können, der in Zellen mit rascher Teilung beschleunigt verläuft. Deshalb kann man auch vermuten, daß die Mitochondrien-Grundsubstanz aus geformten Fermenten besteht, die im Plasma zum Ablauf des Stoffwechsels benötigt werden. Da die Tumorzellen relativ kleine Mitochondrien mit nur wenigen und zum Teil unvollständig ausgebildeten Cristae enthalten, kann man ferner annehmen, daß sich diese Mitochondrien nicht normal bis zu einer maximalen Größe entwickeln, weil sie schon frühzeitig in Funktion treten müssen, indem sie ihre tubuläre Grundsubstanz an das Plasma abgeben.

Schließlich soll noch erwähnt werden, daß mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden bei Tumorzellen bisher keine eindeutigen Verdoppe-

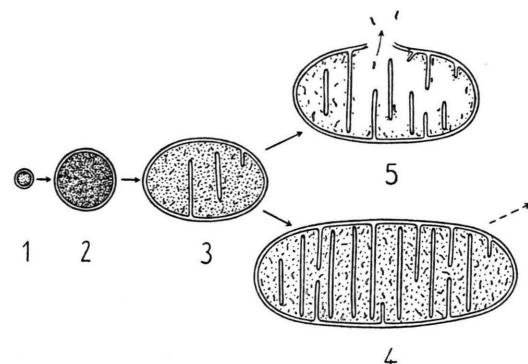


Abb. 14. Schematische Darstellung der Entwicklung, des Feinbaus und der Entleerung der Mitochondrien:
1 und 2: Doppelt konturierte Promitochondrien mit tubulärer Grundsubstanz.

- 3: Junges Mitochondrium, dessen erste Cristae aus dem Innenblatt der Mitochondriumshülle entstehen.
- 4: Großes Mitochondrium einer normalen, ausdifferenzierten Zelle. Das Mitochondrium ist durch die Cristae in mehr oder weniger vollständige Kammern unterteilt, in denen sich die Grundsubstanz befindet.
- 5: Tumor-Mitochondrium, das nicht zur vollen Entwicklung kam, weil es seine Grundsubstanz frühzeitig durch eine Öffnung in der Hülle an das Plasma abgegeben hat.

lungsstadien von Mitochondrien und Promitochondrien beobachtet wurden. Möglicherweise erfolgt hier eine identische Reproduktion des Chondrioms im molekularen Bereich. Über die Entstehung der Promitochondrien kann also noch nichts ausgesagt werden.

Herrn Professor Dr. DANNEEL, Herrn Dr. WOHLFARTH-BOTTERMANN und der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für beratende und finanzielle Hilfe zu Dank verpflichtet.

¹² R. GIESEKING, Mikroskopie [Wien] 9, 186 [1954].

¹³ CH. ROUILLER, F. HAGUENAU, A. GOLDE u. F. LACOUR, Bull. Canc. 43, 10 [1956].