

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Direktorin: Frau Prof. Dr. M. Dieterich

**Schäden der mitochondrialen DNA
bei der Alzheimer-Erkrankung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rachel-Maria Schwarzkopf

aus

München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Andreas Bender

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jörg Tatzelt

PD Dr. Katharina Bürger

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2011

Gliederung

1	Einleitung	7
1.1	Die Alzheimer Erkrankung.....	7
1.1.1	Klinik und Symptomatologie	7
1.1.2	Diagnostik	8
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	8
1.2	Die Mitochondrien.....	11
1.2.1	Einführung und historischer Überblick	11
1.2.2	Aufbau und Funktion der Mitochondrien.....	12
1.2.2.1	Überblick.....	12
1.2.2.2	Die Atmungskette	14
1.2.2.3	Oxidativer Stress	16
1.2.2.4	Oxidativer Stress und das mitochondriale Genom.....	17
1.2.3	Das mitochondriale Genom.....	19
1.2.3.1	Aufbau und Funktion des mitochondrialen Genoms	19
1.2.3.2	Mutationen des mitochondrialen Genoms	22
1.2.4	Mitochondriale Dysfunktion – Ursache von Altern und Degeneration?.....	25
1.2.4.1	Mitochondriale pathologische Prozesse und die Alzheimer Krankheit.....	26
1.3	Real-time Polymerasekettenreaktion – Einführung und theoretische Grundlagen ...	28
1.3.1	Technische Grundlagen und Auswertungsmethode der Real-time-PCR.....	31
2	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	35
3	Materialien und Methoden	36
3.1	Gewebeproben	36
3.2	Chemikalien für die weitere Analyse und Quantifizierung.....	37
3.2.1	Chemikalien für die Kryokonservierung der Gewebe in Form von Gefrierdünnschnitten.....	37

3.2.2	Chemikalien für die Färbung nach Nissl.....	38
3.2.3	Chemikalien für die DNA-Extraktion der dissezierten Neurone	38
3.2.4	Chemikalien für die Quantifizierung der mtDNA-Deletionen durch Real-time-PCR	39
3.3	Geräte und Software der weiteren Analyse und Quantifizierung.....	40
3.3.1	Geräte und Hilfsmittel für die Kryokonservierung der Gewebe in Form von Gefrierdünn­schnitten.....	40
3.3.2	Geräte und Hilfsmittel für die Färbung der Neurone nach Nissl	41
3.3.3	Geräte und Hilfsmittel für die Lasermikrodissektion der gefärbten Neurone.....	42
3.3.4	Geräte und Hilfsmittel für die DNA- Extraktion der dissezierten Neurone	43
3.3.5	Geräte und Hilfsmittel für die Quantifizierung der mtDNA-Deletionen durch Real- Time PCR	43
3.3.6	Geräte und Software für die statistische Analyse.....	45
3.4	Methoden.....	46
3.4.1	Humane Gewebeproben	46
3.4.1.1	Auswahl der Zielregionen.....	46
3.4.1.2	Auswahlkriterien der Gewebespende.....	46
3.4.1.3	Aufbewahrung und Vorbehandlung der Gewebe vor der weiteren Untersuchung	49
3.4.2	Kryostatische Konservierung in Form von Gefrierdünn­schnitten	49
3.4.2.1	Einstellungen des Kryostaten und Verifizierung der Gehirnregion.....	49
3.4.2.2	Anfertigen der Gefrierschnitte	50
3.4.2.3	Aufbewahrung der Gefrierdünn­schnitte	50
3.4.3	Färbung der Neurone nach Nissl.....	50
3.4.3.1	Vorbereitung der Gewebeschnitte für die Färbung nach Nissl.....	51
3.4.3.2	Vorbereitung der Puffer und Lösungen	51
3.4.3.3	Färbeprotokoll der Neuronenfärbung nach Nissl.....	52

3.4.3.4	Nachbehandlung und weitere Aufbewahrung der gefärbten Schnitte	53
3.4.4	Lasermikrodissektion	53
3.4.4.1	Technische Einstellungen	55
3.4.4.2	Mikroskopische Begutachtung und Auswahl der Zielneurone.....	56
3.4.4.3	Dissektion der Zielneurone.....	58
3.4.4.4	Transport und Aufbewahrung der dissezierten Zellen.....	61
3.4.5	Extraktion der DNA	61
3.4.5.1	Protokoll der Extraktion der DNA lasermikrodissezierter Zellen	61
3.4.5.2	Extraktion der Kontroll- DNA.....	62
3.4.6	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion	63
3.4.6.1	Protokoll der rt-PCR	63
3.4.6.2	Auswahl der Gene.....	63
3.4.6.3	Auswahl der Primer und fluoreszierenden Sonden.....	65
3.4.6.4	Mastermix und Ziel-DNA.....	66
3.4.6.5	Technische Vorgaben der DNA-Vervielfältigung im Light-Cycler.....	69
3.5	Statistische Auswertung der Deletionsquantifizierung mit Real-time PCR.....	70
3.5.1	Hypothesen.....	70
4	Ergebnisse	71
4.1	Qualitative Beschreibung der erhaltenen Einzelergebnisse.....	71
4.1.1	Ergebnisse der Real-time PCR.....	71
4.1.2	Quantitative Berechnung der Deletionen	73
4.1.3	Statistische Auswertung der Deletionslevel der untersuchten Regionen im Vergleich.....	74
5	Diskussion	76
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	76
5.2	Methodische Einschränkungen.....	77

5.2.1	Auswahl der Gehirnregionen	77
5.2.2	Analyse- und Quantifizierungsmethodik	78
5.3	Der Dopaminstoffwechsel - Ursache einer spezifischen Vulnerabilität?	80
5.4	Hohe metabolische Aktivität - ein Risiko durch Sauerstoffverbrauch?	82
5.5	Abschließende Zusammenfassung und Ausblick	83
6	Literaturverzeichnis.....	86
7	Abbildungsverzeichnis	97
8	Tabellenverzeichnis.....	98
9	Abkürzungsverzeichnis	99
10	Danksagung.....	101

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Erkrankung

Von Alois Alzheimer im Jahre 1907 erstmals beschrieben[1], ist die nach ihrem Entdecker benannte Alzheimer-Erkrankung eine im öffentlichen Bewusstsein der europäischen Bevölkerung ständig präsente Größe. Sie ist die häufigste nicht vaskuläre Demenzursache im Alter mit ca. 1.000.000 Betroffener in Deutschland[2]. Die letztliche Ursache dieser Erkrankung konnte trotz intensiver Forschung bis jetzt noch nicht geklärt werden. Neues Gewicht bekommt die Alzheimer-Krankheit auch im Rahmen einer alternden Gesellschaft. So macht der Umstand, dass das Erkrankungsrisiko mit steigendem Alter zunimmt, eine intensive wissenschaftliche Beschäftigung mit Pathogenese und Therapiemöglichkeiten unentbehrlich. Einen kurzen Überblick über die Krankheit geben die folgenden Seiten.

1.1.1 Klinik und Symptomatologie

Die Alzheimer-Erkrankung manifestiert sich meist jenseits des 65. Lebensjahres. Typische Symptome sind langsam progrediente Gedächtnis-, Aufmerksamkeits- und Orientierungsstörungen mit gravierenden Beeinträchtigungen des Alltagslebens. Die Abnahme der Merkleistung zeigt sich in Defiziten von Kurz- und Langzeitgedächtnis. Die Fähigkeit zu abstraktem Denken ist ebenso vermindert. Im Gegensatz zu intellektuellen Fähigkeiten bleiben Merkmale der Persönlichkeit relativ lange erhalten, bis sich schließlich im späteren Verlauf Störungen der emotionalen Kontrolle, der Motivation und des Sozialverhaltens manifestieren. Die Kommunikation reduziert sich auf stereotype verbale und gestische Äußerungen, die neuropsychologischen Symptome nehmen kontinuierlich zu, bis schließlich die Pflegebedürftigkeit eintritt. Begleitend kann meist ein oft nur diskret auftretendes Parkinson-Syndrom und Harninkontinenz beobachtet werden. Weitere neurologische Ausfälle fehlen in der Regel[3].

1.1.2 Diagnostik

Standard in der Demenzdiagnostik ist eine umfassende neuropsychologische Untersuchung mittels spezifischer Testbatterien. Häufig eingesetzt werden zum Beispiel der Mini-Mental-State-Test, der Clock-Drawing-Test und eine Untersuchung auf Wortflüssigkeit [4].

Im Elektroenzephalogramm (EEG) kann sich ein verlangsamter Grundrhythmus, ebenso wie eine verlängerte Latenz visuell evozierter Potentiale zeigen. Morphologische Korrelate der klinischen Symptomatik im Computertomogramm, sowie im Kernspintomogramm sind eine ausgeprägte diffuse Hirnatrophie, teilweise mit Betonung der Atrophie im Bereich des Schläfenlappens.

Die Konzentration des TAU-Proteins, auf das im Rahmen der Ätiologie und Pathogenese noch eingegangen werden soll, ist im Liquor der Patienten erhöht[3, 5, 6]. Bisher existiert in der Diagnostik noch kein Goldstandard, mit dem die Krankheit eindeutig diagnostiziert werden kann[7], wenn sich auch neuerdings eine Kombination bestimmter neuropsychologischer Tests als relativ zuverlässig gezeigt hat[8].

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die der Pathologie zugrunde liegende letztliche Ursache der Alzheimer-Erkrankung ist bisher noch nicht bekannt. In jedoch 5-10% der auftretenden Fälle sind Gendefekte auf den Chromosomen 1, 14, und 21 beschrieben. Hier handelt es sich meist um Mutationen des Presenilin-1-Gens (Chromosom 14), oder des Präsenilin-2-Gens (Chromosom 1), sowie des Amyloid-Precursor-Proteins (Chromosom 21). Der Name „Presenilin“ weist hier auf eine frühe Manifestation der Krankheit vor dem 65. Lebensjahr hin - bei den meisten Patienten mit diesem frühen Erkrankungsausbruch wurde einer der drei genannten Gendefekte festgestellt, deren Heredität in allen genannten Fällen einem autosomal-dominanten Erbgang entspricht[9-11].

Histologische Befunde zeigen eine Veränderung in vor allem drei zerebralen Regionen: Hippokampus, Locus coeruleus und frontaler Kortex. Die wesentlichen Befunde sind die so

genannten Alzheimer-Fibrillen, die intraneuronal beobachtet werden und aus pathologischen Konglomeraten des TAU-Proteins (in helikaler und gestreckter Form) bestehen, ein Protein, das unter normalen Umständen als Stabilisator von Mikrotubuli dient[12-14] und für den axonalen Transport von Mitochondrien zur neuronalen Synapse notwendig ist [15].

Extrazellulär lassen sich senile Plaques nachweisen. Der Kern wird von A4- β -Amyloid-Protein gebildet[16], während die äußeren Anteile ebenfalls aus TAU-Protein bestehen[17]. Die 1992 von Hardy und Higgins entwickelte "amyloid-cascade-hypothesis" [18] postuliert A4- β -Amyloid-Protein (A β P) oder auch sein Ausgangsmolekül, das Amyloid-Precursor-Protein (APP) als eigentliche Ursache der Alzheimer-Pathologie. A β P, ein Protein aus 39-42 Aminosäuren, formt die hydrophobe Komponente einer transmembranen Komponente des APP. Die Prozessierung von APP ist prinzipiell durch Sekretase oder Lysosomen möglich. Wird APP an Stelle von Sekretase durch Lysosomen prozessiert, so entsteht durch diese Spaltung intaktes A β P, das konsekutiv zu Amyloid-Plaques präzipitiert und die Bildung von Neurofibrillen und Zelltod nach sich zieht [18]. Die neurotoxische Kapazität von A β P wurde schon früh unter unterschiedlichen Gesichtspunkten diskutiert, so wurden direkte toxische Effekte des A β P alleine [19] oder die durch Präzipitation entstehende vermehrte Vulnerabilität der Neurone [20, 21] für die entstehenden Schäden verantwortlich gemacht.

Aktivierte Gliazellen und Zytokine innerhalb der Amyloid-Plaques weisen auf einen autochthonen Abwehrmechanismus hin. Ebenfalls in der Diskussion steht eine neuroinflammatorische Beteiligung bei der Pathogenese[22, 23].

Ein nachgewiesener Mangel an cholinergen Strukturen, wie der Cholinacetyltransferase (CAT), die für die Synthese von Acetylcholin verantwortlich ist, wird als ursächlicher Grund für die demenziellen Symptome angesehen[24-26]. Das cholinerge Defizit korreliert mit der Zahl der Plaques, deren Zahl allerdings keinen Schluss auf das klinische Ausmaß der Demenz zulässt[22]. Tatsächlich ist entgegen allen Erwartungen die Korrelation zwischen Klinik der Patienten und Amyloid-Akkumulation gering[27, 28].

Die bisherige Forschung der letzten Jahre hat zwar einige Hinweise gezeigt, ist eine letztendliche Antwort auf die Frage nach Grund und Ursache des Morbus (M.) Alzheimer allerdings schuldig geblieben. Auch die pathologische Bedeutung der sogenannten „Meilensteine“ der Alzheimer-Forschung - Aggregation von A β P und neurofibrillären

Formationen - wird zunehmend diskutiert[28]. Beide Phänomene können die Pathogenese und fortschreitende Demenz nicht suffizient erklären. Die regulatorischen Interaktionen von neurofibrillären Bündeln und A β P sind letztlich nicht ursächlich geklärt, und bislang ist es keiner Arbeitsgruppe gelungen, die Ursache der progressiven Demenz zu erklären. Auch die erwähnte „amyloid cascade hypothesis“[29], die sich auf die pathologische Bedeutung des Amyloid-Precursor-Proteins stützt, bietet zu wenig zufriedenstellende Ergebnisse[27]. Ein manifestes Problem dieser Theorie ist zum Beispiel die schwache Korrelation der Menge der Amyloid-Plaques mit der tatsächlichen klinischen Ausprägung der Symptome. Aktuelle Verfechter dieser Theorie postulieren nun vor allem Oligomere von A β P als pathologisch ursächliche Entitäten. Neue Korrelationen der Präzipitatmenge dieser Oligomere mit den klinischen Defiziten liegen allerdings noch nicht vor.

Betrachtet man die Arbeiten der letzten Jahre, so scheint es, dass andere Ansatzpunkte nötig sind, das fehlende Glied in der Kette der Pathologie dieser Krankheit zu finden.

Diesbezüglich hervorzuheben sind die Arbeiten von S.I. Rapoport, die einen besonderen Fokus auf den neuronalen Energiemetabolismus und die Herabregulierung der mitochondrialen Atmungskette legen. Ausgehend von der Tatsache, dass Adenosyl-Triphosphat (ATP), das Endprodukt der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), vor allem an Synapsen und Dendriten konsumiert wird [30], konnte er vor allem mit Hilfe von Positronenemissionstomographie (PET) durch indirekte Messung des zerebralen Energieverbrauchs synaptische Veränderungen zeigen, die mit der Schwere der kognitiven Defizite korrelieren. Sie treten bereits früh im Krankheitsverlauf auf, sind jedoch potentiell reversibel und können in frühem Krankheitsstadium durch kognitive oder sensorische Stimulation überwunden werden. [31, 32]. Erst in späteren Stadien der Krankheit mit fortschreitender Ablagerung der neurofibrillären Bündel kommt es durch die zunehmende Schädigung der Zelle zu einer irreversiblen Herabregulierung von OXPHOS und zu einer fehlenden Aktivierbarkeit der betreffenden Gehirnareale auf Stimulation [15, 33, 34]. Verantwortlich dafür werden vor allem die Schädigung des axonalen Transports von Mitochondrien durch die Kooptation des dafür notwendigen TAU-Proteins zur Synapse gemacht [15].

Die von Rapoport beobachtete Herabregulierung der neuronalen Energieproduktion durch die Abnahme von OXPHOS rückt einen Mangel an Mitochondrien an der neuronalen Synapse ins

Bild. Die Beobachtung eines defizienten Energiehaushalts führt zu einem weiteren Ansatzpunkt, der von einigen Arbeitsgruppen verfolgt wird: Der Hypothese, Alzheimer als Folge von oxidativem Stress zu betrachten[27]. Schädigung durch freie Sauerstoffradikale ist eine der wichtigsten Theorien über das Altern und das Alter ist tatsächlich einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Alzheimer-Erkrankung. Ebenfalls ist bekannt, dass die Mitochondrien eine Hauptquelle für freie oxidative Radikale darstellen[35], wie in dieser Arbeit unter 1.2.4. „Mitochondriale Dysfunktion – Ursache von Altern und Degeneration“ noch ausführlich dargestellt wird. In diesem Kontext soll diese Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung der Ätiopathogenese leisten und auf eine mögliche mitochondriale Beteiligung - in diesem Fall in Form von Schäden an der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNA für „*desoxyribonucleic acid*“) - an pathologischen Prozessen eingehen.

Im Folgenden sollen die Charakteristika dieser Zellorganellen zum besseren Verständnis ausführlich dargestellt werden.

1.2 Die Mitochondrien

1.2.1 Einführung und historischer Überblick

Über hundertfünfzig Jahre sind seit der Entdeckung der „Kraftwerke der Zelle“ vergangen. Inzwischen hat das Interesse an den Zellorganellen, die ein eigenes Genom besitzen, stetig zugenommen. Nach der Erstbeschreibung Mitte des 19. Jahrhunderts, wurde der Begriff „Mitochondrion“ - gebildet aus den griechischen Begriffen für „*mitos*“: Faden und „*chondros*“: Körnchen - von Claudius Regaud 1909 erstmals eingeführt[36].

Ende der fünfziger Jahre postulierten L. Ernster, D. Ikkos und R. Luft die Dysfunktion der Mitochondrien als wesentlichen Pathogenitätsfaktor eines Hypermetabolismus nicht thyreoidalen Ursprungs[37]. Noch bevor man von der Existenz einer eigenständigen mitochondrialen DNA wusste, war somit die erste mitochondriale Krankheit beschrieben.

Kurz darauf wurden Anfang der sechziger Jahre Hinweise auf DNA-Spuren innerhalb der Mitochondrien gefunden und das Vorhandensein der mitochondrialen DNA (mtDNA)

entdeckt[38]. Die Entwicklung neuer histochemischer Methoden führte zur Entdeckung der mitochondrialen Myopathien, gekennzeichnet durch sogenannte „ragged red fibers“-Muskelfasern, die durch eine pathologische Akkumulation der geschädigten Mitochondrien in spezieller Färbung rot erscheinen.[39-41]

Nachdem die Sequenz der mtDNA 1981 erstmals entschlüsselt wurde[42], folgte Ende der achtziger Jahre ein weiterer Meilenstein der mitochondrialen Forschung: Wallace et al. beschrieben die ersten pathologischen Mutationen der mtDNA[43]. Seit dieser Zeit wurde die Bedeutung der mtDNA in der Pathologie vieler verschiedener Krankheiten und Syndrome diskutiert und bewiesen. In den letzten Jahren wurden über 50 verschiedene Punktmutationen[44] und über 100 verschiedene Deletionen der mtDNA aufgedeckt[45]. Mitochondriale Syndrome wie MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) oder das Kearns-Sayre-Syndrom sind gängige Begriffe moderner Medizin. Doch der Begriff „mitochondriale Medizin“[46] beinhaltet viel mehr Pathologien als die nur relativ seltenen „Exoten“ – die mitochondrialen Erkrankungen im engeren Sinn. Die Forschung der letzten Jahre hat ergeben, dass eine Dysfunktion der Mitochondrien wahrscheinlich auch einen Beitrag zu überaus häufigen Krankheiten wie zum Beispiel malignen Neubildungen leistet. Vor allem auch mit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen, wie Multipler Sklerose, Parkinson, dem natürlichen Alterungsprozess des Menschen oder auch der Alzheimer-Erkrankung besteht eine Assoziation[46-48]. Diese Erkenntnisse bilden auch die Grundlage für die Fragestellung dieser Arbeit nach einem Zusammenhang von Schäden der mtDNA und dem M. Alzheimer. Da die Mitochondrien jedoch einige Besonderheiten aufweisen, sei an dieser Stelle ein kurzer Überblick über Funktion, Struktur und genetische Besonderheiten dieser Zellorganellen aufgeführt.

1.2.2 Aufbau und Funktion der Mitochondrien

1.2.2.1 Überblick

Der Ursprung der Mitochondrien in der eukaryoten Zelle geht wohl auf eine endosymbiotische Beziehung von bakterienähnlichen Organismen und eukaryoten Zellen

zurück. Die Mikroorganismen übernahmen innerhalb der Symbiose wichtige Aufgaben der Zelle, so vor allem Energiegewinnung und Entsorgung von überflüssigen metabolischen Abfällen[49] und avancierten so zur wichtigsten Energiequelle der Zelle. Letztendlich etablierten sie sich als essentielle Ressourcen für die zelluläre Homöostase[50]. Im Gegenzug stellte die Zelle den Mitochondrien aber eine Menge an cytosolischen Proteinen zur Verfügung, von denen ihr Stoffwechsel weitgehend abhängt[51]. Dieser Proteinaustausch wurde so exzessiv betrieben, dass heute nur noch 14-16% der modernen mitochondrialen Proteine auf den eigentlichen bakteriellen Endosymbionten zurückverfolgt werden können[52].

Eine Doppelmembran aus Lipiden trennt die mitochondriale Matrix vom Cytosol der Zelle. An der inneren Membran ist die Atmungskette lokalisiert, in der Energie in Form von Adenosyltriphosphat (ATP) generiert wird[50]. Um den hierfür notwendigen Elektronengradienten aufrechtzuerhalten, ist die innere Membran undurchlässig und dient als Barriere für Ionen und andere Moleküle.

Die mitochondriale Matrix selbst enthält zahlreiche Enzyme des Citratzyklus und der β -Oxidation, die notwendig für den Abbau von Kohlehydraten und Fetten sind[46].

Während die innere Membran eine undurchdringliche Ionenbarriere darstellt, ist die äußere Membran porös und erlaubt den Austausch von Verbindungen niedrigen Molekulargewichts zwischen Zytosol und Membranzwischenraum. Mittlerweile ist außerdem bekannt, dass auch zwischen den Mitochondrien einer Zelle, die dort zu Hunderten vorhanden sind, ein reger Austausch vor allem genetischen Materials besteht[53]. Der inneren Membran anliegend ist die mtDNA in die Matrix eingebettet, auf die in Kürze unter 1.2.3.1. (Aufbau und Funktion des mitochondrialen Genoms) ausführlicher eingegangen wird.

Obwohl man weit davon entfernt ist, die dynamische Funktion oder gesamte Morphologie der Mitochondrien gänzlich zu verstehen[46], gibt es doch vielgestaltige Beweise, dass sie essentiell wichtig für die zelluläre Funktion sind. Unter anderem ist bekannt, dass die Mitochondrien an der Signaltransduktion, Stoffwechsel von Lipiden, Steroiden, Nukleotiden und Aminosäuren und Apoptose Anteil haben. Über die Regulation der zellulären Calciumkonzentration beeinflussen sie überdies die Entstehung von Aktionspotentialen, die Stabilität des Cytoskeletts und die nukleäre Genexpression[54, 55]. Am wichtigsten ist jedoch

unbestritten ihr Beitrag zum Energiestoffwechsel der Zelle, wie β -Oxidation, Zitratzyklus und vor allem zur Energieproduktion der Zelle in der Atmungskette[50].

1.2.2.2 Die Atmungskette

Die Atmungskette dient der zellulären Energiegewinnung und erfüllt die wahrscheinlich wichtigste Aufgabe der Mitochondrien innerhalb der Zelle: Durch eine Elektronentransportkette und oxidative Phosphorylation entsteht Energie in Form von ATP.

Die fünf Proteinkomplexe der Atmungskette sind an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und bestehen aus Komplex I (reduziertes Nikotinamid Adenin Dinukleotid-Dehydrogenase (NADH)-Ubiquinon-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Dehydrogenase-Ubiquinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubiquinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase), Komplex IV (Cytochrom- c-Oxidase) und schließlich Komplex V (ATP-Synthase)[56]. Außer den großen Proteinkomplexen besteht die Atmungskette auch aus den zwei kleineren Elektronentransportern Ubiquinon (oder auch Coenzym Q 10) und Cytochrom c.

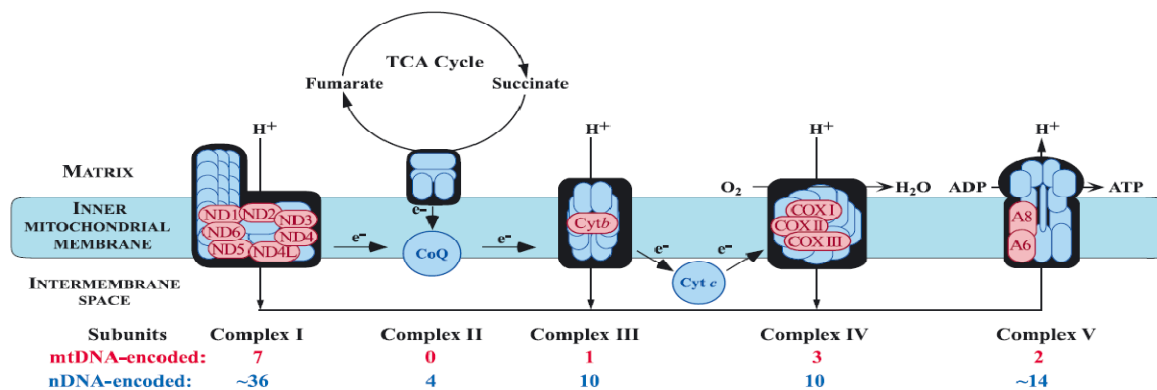


Abbildung 1 [57]: Schematische Zeichnung der Atmungskette.

Die mtDNA-kodierten Untereinheiten sind in rot, die nukleär kodierten Untereinheiten in blau dargestellt. Elektronen (e^-) fließen entlang des Gradienten, gleichzeitig werden Protonen (H^+) durch die Komplexe I, III und IV aus der Matrix in den intermembranösen Spalt gepumpt. Die Protonen fließen dann durch Komplex V wieder bei gleichzeitiger ATP-Produktion in die Matrix zurück.

CoQ: Coenzym Q 10 (Ubiquinon); Cyt c: Cytochrom c; Cyt b: Cytochrom b; COX: Cytochromoxidase; ND 1-6: Untereinheiten von Komplex I; A8 und A6: Untereinheiten Komplex V (ATP-Synthase)

Die ATP-Gewinnung steht am Ende zweier wesentlicher Prozesse: Elektronen in Form von Wasserstoff-Ionen, die aus der Reduktion von NADH und FADH (Flavin Adenin Dinukleotid) durch β -Oxidation und Citratzyklus innerhalb der mitochondrialen Matrix entstehen, werden innerhalb der Proteinkomplexe transportiert und auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei gleichzeitig Wasser entsteht. Die dadurch gewonnene Energie wird von den Komplexen dazu benutzt, Protonen aus der Matrix in den intermembranösen Spalt zu pumpen. Dadurch entsteht ein Protonengradient, den die ATP-Synthase (Komplex V) zur Erzeugung von ATP nutzt: sie kann als eine Art Turbine betrachtet werden, deren Rotor (F₀) in die Membran eingebettet ist, durch die die Protonen entlang des Gradienten zurück in die Matrix fließen. Der Stator der Turbine (der F₁-Teil des Proteins) ragt in die Matrix hinein und generiert dort ATP durch die Phosphorylation von Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat[58, 59].

Die Proteine der Atmungskette werden gemeinsam von nukleärer und mitochondrialer DNA kodiert, wobei die nukleäre DNA einen wesentlich größeren Anteil an der Kodierung trägt[60]. Nur ein kleiner Teil der Atmungsketten-Untereinheiten wird von mitochondrialer DNA kodiert: nämlich sieben Untereinheiten von Komplex I, eine Untereinheit von Komplex III, drei Untereinheiten von Komplex IV und zwei Untereinheiten von Komplex V[61]. Komplex II wird ausschließlich von nukleärer DNA kodiert. Trotzdem können Schäden des mitochondrialen Genoms die Funktion der Atmungskette wesentlich beeinträchtigen[56]. Da die Zelle völlig von der ATP-Produktion der Atmungskette abhängig ist, haben Veränderungen des ATP-Spiegels ernste Konsequenzen für den Zellmetabolismus. Selbst eine geringe Abnahme der Effizienz der ATP-Produktion kann schon zu Symptomen führen[46].

In letzter Zeit wurde gezeigt, dass die Atmungskette nicht nur der Energieerzeugung dient, sondern auch eine Rolle in anderen zellulären Signalwegen und Stoffwechselfvorgängen spielt. So wird zum Beispiel durch die Aktivität der Cytochromoxidase gleichzeitig die Apoptose[62] mit reguliert.

Ein auch im Hinblick auf diese Arbeit weiterer wichtiger Aspekt der Atmungskette sind allerdings die reaktiven Sauerstoffradikale (auch ROS für „*reactive oxygen species*“). Sie entstehen durch den Elektronentransport der Atmungskette im Rahmen der Reaktionen mit Sauerstoff als Nebenprodukt. Es wird geschätzt, dass bis zu 2% des in der Atmungskette umgesetzten Sauerstoffs zur Entstehung freier Radikale führt. Durch ihre Konzentration in der

Zelle regulieren sie ebenfalls maßgeblich den Zellmetabolismus[35]. Eine ihrer wichtigsten Eigenschaften ist jedoch, dass sie durch ihre Reaktionsfreudigkeit für Schäden an der Zelle verantwortlich sind und somit eine Situation schaffen, die als „oxidativer Stress“ bekannt geworden ist - und die schon früh als Ursache für Altern, Degeneration und auch Alzheimer diskutiert wurde.

1.2.2.3 Oxidativer Stress

„Oxidative stress is an unavoidable consequence of life in an oxygen-rich atmosphere. (...) Oxidative reactions cause iron to rust, potato chips to spoil, milk to go sour, and oil or meat to turn rancid.”[63]

Wie alle Dinge, die dem Sauerstoff ausgesetzt sind, ist auch die menschliche Zelle nicht vor oxidativen Reaktionen gefeit, die ein natürliches Nebenprodukt der kontinuierlichen Energieproduktion der Zelle sind. Essentiell für die Generierung der Zellenergie, ist Sauerstoff ein überaus toxisches Molekül. Übersteigt seine Konzentration die in der Atmosphäre bestehenden 21%, so wirkt Sauerstoff schädlich, bei 100% ist Sauerstoff (O_2) für Säugetiere sogar tödlich[64]. Die Gefährlichkeit von Sauerstoff beruht vor allem auf der Reaktionsfreudigkeit seiner „Abfallprodukte“, sogenannten Oxidantien, (ROS, siehe 1.2.2.2.), die Biomoleküle durch Oxidation schädigen. In der Zelle entstehen sie vor allem in den Mitochondrien im Rahmen der oxidativen Phosphorylation der Atmungskette. Es ist bekannt, dass sich ihre Konzentration auch durch die Anwesenheit anderer Ionen und Verbindungen regulieren lässt. So erhöht zum Beispiel eine hohe Eisenkonzentration ihre Bildung[65]. Unter diesen Oxidantien sind vor allem die Moleküle Superoxid ($O_2\bullet$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxyl-Radikale ($HO\bullet$) und möglicherweise auch Singulett-Sauerstoff (1O_2) an entstehenden Schäden beteiligt[66]. Offensichtlich sind sie auch an der Regulation verschiedenster physiologischer Zellprozesse beteiligt. So wird vor allem H_2O_2 eine Rolle in der Redox-Regulation von Signaltransduktion[67, 68], Zellproliferation[69, 70], der zellulären Antwort auf oxidativen Stress[71, 72] und Apoptose[73, 74] zugesprochen.

Ihre Reaktionsfreudigkeit resultiert in der Oxidation zellulärer Makromoleküle verschiedenster Art, hauptsächlich betroffen sind jedoch DNA[75], Proteine[76], und

Lipide[77]. Der Umstand, dass Sauerstoff für die Zelle gleichzeitig unersetzlich und doch auch höchst giftig ist, wurde unter dem Begriff „the oxygen paradox“ von K.J. Davies prägnant zusammengefasst[78].

Um diesen Schäden entgegenzuwirken, besitzt die Zelle mehrere antioxidative Verbindungen, die als Radikalfänger die reaktionsfreudigen oxidativen Radikale inaktivieren[79]. Doch können diese multiplen Abwehrsysteme in Form von Vitaminen und verschiedenen Enzymkomplexen die oxidativen Schäden zellulärer Strukturen nicht gänzlich verhindern[80]. Der Begriff „oxidativer Stress“ an sich bezeichnet ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Systemen[80] der Zelle. Dieses Ungleichgewicht kann einmal aus einer erhöhten Exposition gegenüber Oxidantien, ineffektivem Oxidationsschutz, oder einer Kombination aus beiden Mechanismen resultieren[81].

1.2.2.4 Oxidativer Stress und das mitochondriale Genom

Als zentraler Ort der Energieproduktion durch die Atmungskette sind die Mitochondrien natürlicherweise oxidativen Reaktionen besonders ausgesetzt[82]. Für H₂O₂ stellen sie sogar den Hauptproduktionsort in der Zelle dar[35]. Weil sie sehr viele freie oxidative Radikale enthalten[83], weisen insbesondere mitochondriale Strukturen ein hohes Risiko für Schäden durch Oxidation auf. Und in der Tat wurden sowohl an mitochondrialen Proteinen, als auch an mitochondrialen Lipiden erhöhte oxidative Schäden mit steigendem Alter beschrieben[66, 76]. Betrachtet man jedoch die mtDNA, so lässt sich eine besondere Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Schäden feststellen: Im Vergleich zu nuklärer DNA lagen die durch oxidativen Stress erzeugten Schäden der mtDNA - in verschiedenen Geweben gemessen - zehnfach höher[84, 85]. Neben ihrer geringen Größe, den mangelnden Reperaturmechanismen und den fehlenden Histonen[86], werden auch die Lokalisation der mtDNA an der inneren Mitochondrienmembran - direkt der Atmungskette und somit dem Produktionsort der oxidativen Radikale benachbart - als möglicher Grund dieser Anfälligkeit diskutiert. Aus den so entstandenen Schäden der mtDNA resultiert eine abnehmende Effektivität der Atmungskette, deren Proteine unter anderem von der mitochondrialen DNA kodiert werden. Daraus ergibt sich die Hypothese eines „circulus vitiosus“: Eine

Akkumulation geschädigter mtDNA führt zu einer defekten Atmungskette, die als Effekt wiederum eine steigende Anzahl reaktiver Oxidantien produziert. Diese schädigen im Gegenzug die mitochondriale DNA[82, 87, 88], der letztendlich dazu führen kann, dass die Mitochondrien nicht mehr in ausreichendem Umfang Energie für die Zellen bereitstellen können[82]. Die Folge dieser „respiratorischen Insuffizienz“ ist letztendlich der Zelluntergang, die zelluläre Grundlage neurodegenerativer Prozesse. Zusammenfassend sind diese Theorien in folgender Grafik schematisch aufgezeichnet:

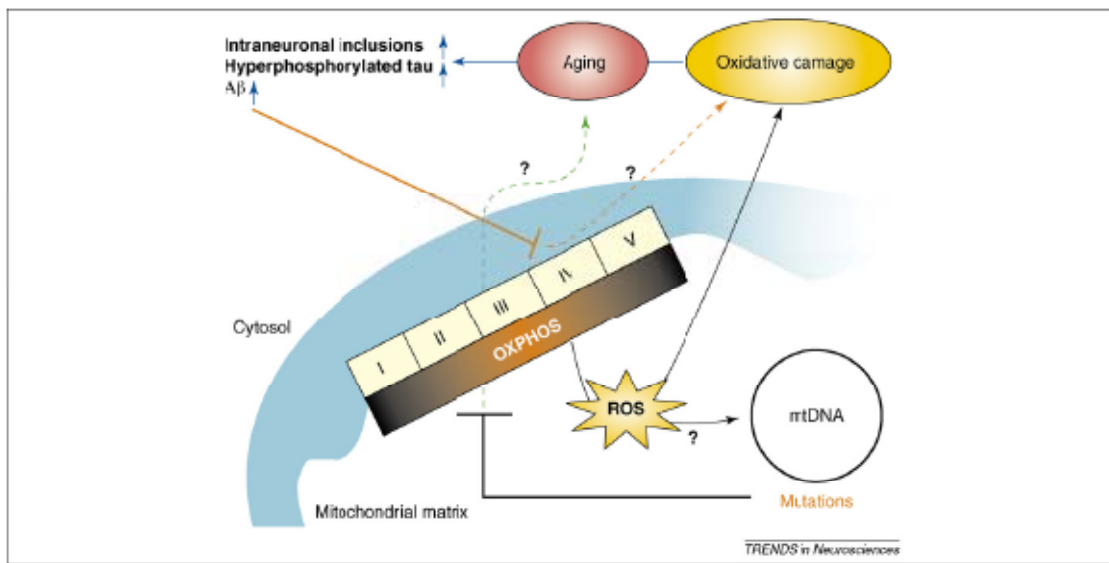


Abbildung 2 [89]: Schematischer Überblick über die Beziehung von OXPPOS - oxidativem Stress und Neurodegeneration.

Die Aktivität der Atmungskette führt zur Bildung von oxidativen Radikalen (ROS), die durch oxidative Wirkung für Schäden an der mtDNA verantwortlich sein könnten. Dies wiederum führt zu einer Schädigung der Atmungskette und dadurch konsekutiv zu einem Anstieg der ROS-Produktion. Die „vicious cycle theory of aging“, postuliert einen Zusammenhang von gesteigerter ROS-Produktion und oxidativem Stress mit Altern und Neurodegeneration.

Eine kurze Beschreibung des mitochondrialen Genoms soll die Grundlage für das Verständnis der pathologischen Prozesse bilden, auf denen die Theorien beruhen, die für die Fragestellung dieser Arbeit bedeutsam sind.

1.2.3 Das mitochondriale Genom

1.2.3.1 Aufbau und Funktion des mitochondrialen Genoms

Das mitochondriale Genom wird normalerweise mütterlich vererbt[90], wenn auch vereinzelt über väterliche Vererbung berichtet wurde[91]. In jeder Zelle können – im Gegensatz zu nuklearer DNA - tausende von mtDNA Kopien enthalten sein[92].

Die Doppelstrang-DNA ist nicht in helikaler Struktur, sondern ringförmig aufgebaut und an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Insgesamt enthält das mtGenom nur 37 Gene[42]. Von diesen Genen sind 24 für die Translation der mtDNA und die mitochondriale Proteinsynthese unerlässlich, die restlichen 13 kodieren für Untereinheiten der Atmungskette[61]. Mit 16.5 Kilobasen (kb) ist das mitochondriale Genom im Vergleich zum nuklearen Genom, das ca. 3 Milliarden Basenpaare enthält, relativ klein[42]. Allerdings sind diese Basenpaare fast ausschließlich Exons mit kodierender Funktion. Nur ein kleiner Teil von 1 kb ist nicht kodierend. Die regelrechte Struktur und Sequenz der restlichen Basenpaare ist deshalb essentiell wichtig für die Funktion der Atmungskette[93] und des zellulären Energiestoffwechsels - obwohl die Mehrheit der Untereinheiten der Atmungskette von nuklearen Genen kodiert wird[60].

Für die Replikation, deren genauer Mechanismus zur Zeit noch nicht völlig geklärt ist, ist das Enzym Polymerase Gamma (POLG) zuständig[94]. POLG spielt auch bei der Reparatur von entstandenen Schäden der mtDNA eine bedeutende Rolle. Das Reparatursystem der mtDNA als solches ist jedoch im Vergleich mit dem des nukleären Genoms wahrscheinlich unzureichend angelegt[86, 95, 96] und könnte dadurch die Persistenz einmal entstandener Mutationen begünstigen. Andererseits sind es möglicherweise sogar die vorhandenen Reparaturmechanismen, die v.a. zur Entstehung von mtDNA-Deletionen führen[97]. Auf den genauen Mechanismus wird unter 1.2.3.2. (Mutationen des mitochondrialen Genoms) detaillierter eingegangen.

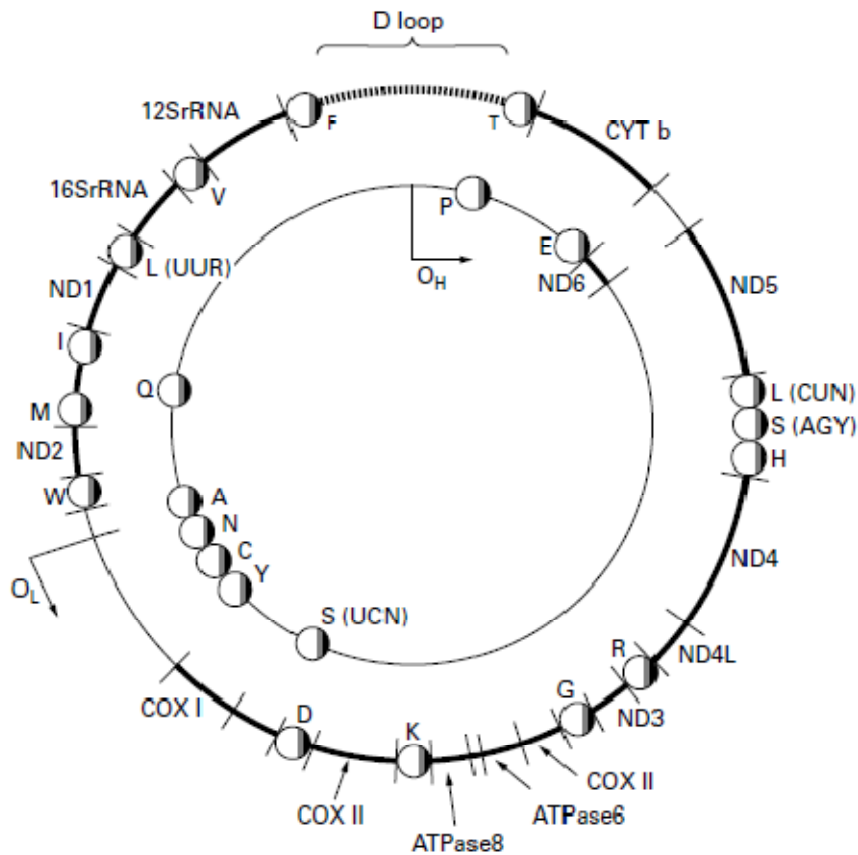


Abbildung 3 [93] : Die mtDNA.

Die nicht kodierende Region ist mit D-Loop für „displacement“ bezeichnet. OL bezeichnet den Replikationsursprung für den leichten (inneren) Strang, OH den Replikationsursprung des schweren, äußeren Stranges, der in der Replikation die Rolle des Führungsstranges übernimmt. Der Bereich zwischen OH und OL wird „major arc“ bezeichnet (hier nicht näher gekennzeichnet). Er umfasst die meisten Deletionen der mtDNA, u.a. auch die „common deletion“ [82, 97] mit dem in dieser Arbeit besonders untersuchten Gen ND4. Demgegenüber steht der „minor arc“. Er ist deletionsstabil und enthält das Gen ND1, das in dieser Arbeit ebenfalls besonders untersucht wurde.

Die Vererbung des mitochondrialen Genoms weist einige Besonderheiten auf, die vor allem hinsichtlich entstehender Pathologien bedeutsam werden können (für einen Überblick über mitochondriale Genetik siehe z.B. [50, 97-99]). Von den Mendelschen Regeln, die für das nukleäre Genom bedeutsam sind, unterscheidet es sich vor allem wesentlich in drei Ausnahmen: durch die in der Regel mütterliche Vererbung, durch Heteroplasmie oder den sog. „threshold-effect“ und durch das Phänomen der mitotischen Segregation[56].

Die mütterliche Vererbung kommt allen Anschein nach durch den aktiven Abbau der spermalen Mitochondrien nach der Befruchtung zustande[100] - so erhält die Zygote ausschließlich Mitochondrien der Mutter. Eine eventuelle Mutation wird die Mutter eventuell

an alle Kinder weitergeben - doch nur die Töchter werden sie weitervererben. Gleichwohl wurden in letzter Zeit einige Ausnahmen dieser bisher allgemein akzeptierten Theorie der mütterlichen Vererbung berichtet[91].

Da in der Zelle Mitochondrien in hoher Zahl vorhanden sind und jedes Mitochondrium eigene DNA in zahlreichen Kopien enthält, kann die Anzahl der mtDNA- Moleküle die Tausend weit übersteigen. Eine etwaige Mutation des mtGenoms muss allerdings nicht in jeder Kopie enthalten sein. Meistens haben sporadische Mutationen keine Konsequenz. Da das mtGenom sich auch in ruhenden Geweben wie Gehirn und Skelettmuskel kontinuierlich und unabhängig vom Zellzyklus teilt und neu bildet[101], wird in einigen Fällen allerdings die mtDNA mit einer bestimmten Mutation mehrere Male repliziert.

Oft enthält die Zelle in diesem Fall sowohl Kopien von normaler Wildtyp-mtDNA, als auch Kopien mutierter mtDNA. Dieses Phänomen ist als Heteroplasmie bekannt. Der Anteil mutierter mtDNA an der gesamten mtDNA einer Zelle ist sehr variabel: Er kann zwischen 0 und 100% schwanken. Erst, wenn der Anteil mutierter mtDNA einen gewissen Schwellenwert übersteigt, kann es zu Schäden der Atmungskette und zu einer Abnahme der respiratorischen Fähigkeit der Zelle kommen, genannt „*threshold effect*“. Dieser Schwellenwert ist ebenfalls variabel. Er unterscheidet sich von Gewebe zu Gewebe und von Mutation zu Mutation[50, 57]. Typischerweise allerdings liegt dieser Schwellenwert bei Punktmutationen um die 85%[102, 103], während er bei Deletionen ca. 60% beträgt[104].

Die mitotische Segregation beschreibt die zufällige Verteilung der Mitochondrien bei der Zellteilung. Teilt sich eine heteroplastische Zelle, so können die Tochterzellen eine unterschiedlich hohe Anzahl mutierter mtDNA erhalten. Das kann dazu führen, dass eine Zelle einen sehr hohen Anteil mutierter mtDNA erhält und respiratorisch insuffizient wird. Auch kann sich der Gesamtanteil mutierter mtDNA innerhalb eines Gewebes ändern und somit auch Änderungen in der Effektivität des Energiehaushaltes dieses Gewebes oder Organs bewirken[105]. Es ist möglich, die respiratorische Insuffizienz einer Zelle sichtbar zu machen: Zellen, deren Atmungskette signifikant geschädigt ist, werden bei einer Färbung des Enzyms Cytochromoxidase C (COX, Komplex IV der Atmungskette) nicht angefärbt[106, 107]. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass die Zahl respiratorisch insuffizienter Zellen in verschiedenen Geweben mit höherem Alter steigt[108-110] - wie es auch bei Deletionen der mtDNA der Fall

ist. Tatsächlich wurde bewiesen, dass die meisten der COX-defizienten Zellen ein großes Ausmaß an mtDNA-Deletionen zeigten[106].

1.2.3.2 Mutationen des mitochondrialen Genoms

Mindestens einer unter 8000 Menschen ist Träger einer pathogenetischen mtDNA-Mutation [111], im allgemeinen Rearrangements, Punktmutationen und Deletionen.

Die häufigsten Mutationen der mtDNA, die eine direkte pathologische Konsequenz mit klinischer Manifestation nach sich ziehen, sind Punktmutationen oder Deletionen[97]. Auf diese soll im Rahmen dieser Arbeit besonders eingegangen werden.

D.C. Wallace erbrachte 1988 den ersten Beweis, dass eine mtDNA-Mutation direkt für das Auftreten einer Krankheit verantwortlich war[43]. Kurz darauf beschrieb die Arbeitsgruppe um Holt et al. Deletionen der mtDNA als Ursache einer Myopathie[112].

In den letzten Jahren zeichnete sich zunehmend ab, dass Deletionen der mtDNA auf drei verschiedene Arten mit pathologischen Prozesse in Zusammenhang gebracht werden können[97]: Im ersten Fall ist eine einzige Deletion für eine sporadisch aufgetretene mitochondriale Erkrankung verantwortlich, diese Deletion ist dann auch in jeder Zelle des betroffenen Gewebes auffindbar und in allen Zellen und Geweben identisch[113].

Im zweiten Fall lässt sich die Ursache für eine mitochondriale Krankheit nicht auf ausschließlich eine einzige Deletion zurückführen. Hier zeigen sich verschiedenartige Deletionen in den betroffenen Geweben („multiple Deletionen“), vor allem Muskel und Nervensystem[109]. Der ursächliche genetische Defekt betrifft u.a. auch nukleäre Gene, die Proteine für den mitochondrialen Nukleotid-Stoffwechsel, als auch für die Reparatur der mtDNA kodieren (v.a. *C10orf2* *POLG* und *POLG2*)[114]. Mutationen in diesen Proteinen wiederum können letztendlich als Ursache für die verschiedenen Deletionen der mtDNA in Frage kommen[115], genauso wie sogar der Mechanismus der Reparatur an sich[97].

Das dritte Szenario betrifft alternde und neurodegenerativ betroffene Gewebe. In diesen Geweben wurden - wie folgend in diesem Kapitel noch ausgeführt werden wird - in vielen Fällen mtDNA-Deletionen beschrieben (einen detaillierten Überblick geben folgende

Veröffentlichungen: [87, 108, 112, 116]). Hier ist das Ausmaß der mtDNA-Schäden jedoch wesentlich geringer als im Falle einer mitochondrialen Krankheit. Eine Ausnahme allerdings stellt die Parkinson-Erkrankung dar: Hier wurde in den Neuronen der Substantia nigra in mehreren Arbeiten ein Deletionsanteil (Heteroplasmiegrad) von bis zu 50% beschrieben[108, 117].

Die meisten Deletionen der mtDNA betreffen den sog. *major arc* des Genoms. In über 85% der Fälle sind sie von kurzen *direct repeats* flankiert[118, 119] – identischen Wiederholungen von Trinukleotidsequenzen, die in großer Anzahl im humanen Genom vorkommen und in ihrer Länge stark variieren können. Sie werden für eine stattliche Anzahl pathologischer Schädigungen der DNA verantwortlich gemacht: so verursachen sie zahlreiche Replikationsfehler und instabilisieren das Genom, so dass es an dieser Stelle vermehrt zu Brüchen kommt. Insofern stellen *direct repeats* ein hohes Risiko für das Auftreten einer Mutation oder Deletion dar[120, 121]: Ist es einmal zum Bruch des Doppelstrangs gekommen, könnten auch die Reparaturmechanismen für die Persistenz einer Mutation oder Entstehung einer Deletion mitverantwortlich sein, wie es auch schon für das nukleäre Genom von *Escherichia coli* und Mensch postuliert wurde[122-124]: Doppelstrangbrüche führen zur Aktivierung der Reparatursystems in Form der oben erwähnten exonukleaseaktiven Enzyme. Freie Einzelstränge verbinden sich nun mit anderen mikrohomologen Sequenzen[125] (andere Einzelstrang-DNA, *Repeat*-Sequenzen oder alternativ auch Sequenzen des nicht-kodierenden Abschnitts). Es folgt die Reparatur mit Ligation und Abtragung der zweiten, exponierten Hälfte des ehemaligen Doppelstrangs. Als Resultat findet sich ein „intaktes“ mtGenom, das nun allerdings eine Deletion enthält[97].

Unabhängig von ihrer Lokalisation oder auslösender Krankheit sind die mtDeletionen sich alle sehr ähnlich und teilen dieselben Kennzeichen wie Größe oder Präsenz flankierender *repeats*[126]. Ein Umstand der trotz unterschiedlicher Klinik der betroffenen Patienten einen ähnlichen Entstehungsmechanismus der Deletionen vermuten lässt[97].

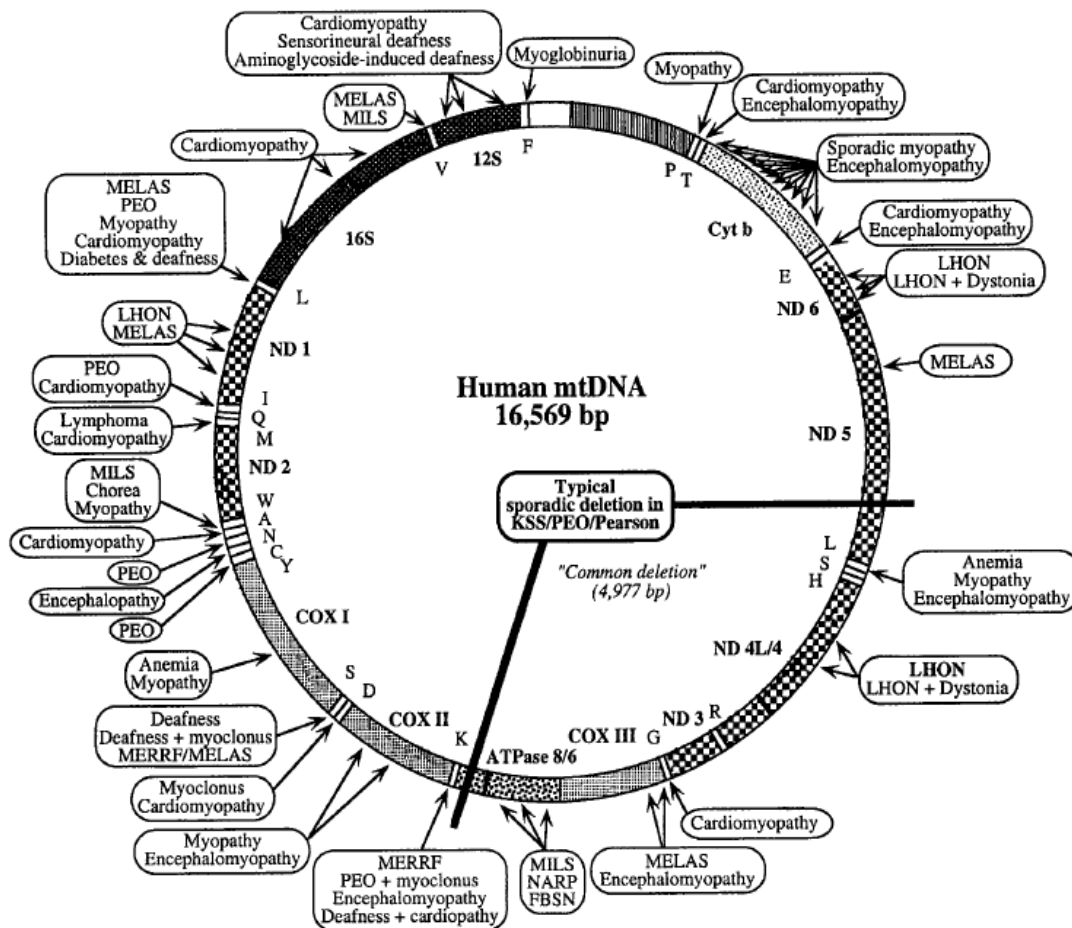


Abbildung 4 [61]: Skizze der menschlichen mtDNA.

Die unterschiedlichen Schattierungen bezeichnen die jeweiligen kodierenden Abschnitte für Proteine der Atmungskette und der beiden RNA's. Zusätzlich sind klinische mitochondriale Syndrome ihren ursächlich zugrunde liegenden genetischen Schäden im mtGenom zugeordnet. Besonders hervorgehoben ist rechts im Bild die „Common deletion“, die u.a. auch das in dieser Arbeit untersuchte Gen ND4 umfasst, das sehr häufig von Deletionen betroffen ist.

Abkürzungen: FSBN, familial bilateral striatal necrosis; KSS, Kearns-Sayre-Syndrom; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; MELAS, mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; MERRF, myoclinic epilepsy with ragged red fibers; MILS, maternally inherited Leigh-syndrom; NARP, neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa; PEO, progressive external ophthalmoplegia.

Initial konzentrierten sich die Beobachtungen auf die sog. „Common deletion“, eine Deletion, die 4977 Basenpaare (bp) umfasst und im major arc des mtGenoms lokalisiert ist. Diese Deletion wurde sowohl bei Patienten mit mitochondrialen Krankheiten (Kearns-Sayre-Syndrom, Chronisch Progressive Externe Ophthalmoplegie), als auch bei ansonsten unauffälligen älteren Kontrollpersonen v.a. im Herz- und Skelettmuskel entdeckt. Bei

jüngeren Personen war sie jedoch in denselben Geweben nicht auffindbar[127-129]. Corral-Debrinski et. al. wiesen eine Zunahme dieser Deletion in alterndem Gehirngewebe nach[116].

1.2.4 Mitochondriale Dysfunktion – Ursache von Altern und Degeneration?

Die Idee, die Mitochondrien als zugrunde liegende Ursache des biologischen Alterns und degenerativer Krankheiten zu betrachten, entwickelte sich auf der Basis der Theorien über den oxidativen Stress. Im Jahre 1908 hatte der Münchner Hygieniker und Ernährungswissenschaftler Max Rubner in seiner Abhandlung über Stoffwechsel, Energieverbrauch und Körpermasse, erstmals die umgekehrte Korrelation von Sauerstoffverbrauch und Lebensdauer beschrieben[130]. Obwohl die daraus entwickelten Theorien heute weitgehend aufgegeben sind, lenkten sie doch die Aufmerksamkeit der Wissenschaft auf den Sauerstoff, der, wie vorher bereits ausgeführt, ein überaus toxisches Molekül für biologische Systeme darstellt. Die Entdeckung, dass freie Sauerstoff-Radikale als Reaktion auf radioaktive Bestrahlung und hohe Sauerstoffexposition in biologischen Systemen generiert werden[36, 131], löste eine kleine Sensation aus - galten sie doch nach bestehender Lehrmeinung als zu reaktiv, um in situ existieren zu können[132].

In dem Bewusstsein, dass radioaktive Bestrahlung unter anderem für neoplastische Tumorerkrankungen und Altern verantwortlich ist, entwickelte Denham Harman 1956 seine „*free radical theory of aging*“, in der er postulierte, dass der Alterungsprozess in direktem Zusammenhang mit der Entstehung freier Radikale stünde[133]. Im Jahre 1972 formulierte Harman dann seine provokative These von den Mitochondrien als „biologische Uhr“[37] und machte sie damit direkt für den Alterungsprozess verantwortlich. Eine Unterstützung dieser Theorie brachte die Entdeckung, dass in den Mitochondrien tatsächlich ROS, v.a. in Form von H₂O₂ entstehen[134].

Die Diskussion über einen mitochondrial verursachten Alterungsprozess setzte sich in den folgenden Jahren fort und die Ergebnisse zeigten, dass oxidative Schäden sich tatsächlich mit steigendem Alter häuften[39, 135, 136]. Kurz darauf rückte die mtDNA in den Fokus der Aufmerksamkeit und Linnane et al. schlugen Mutationen der mtDNA als Ursache für Altern und Neurodegeneration vor[87].

Linnane und Kollegen machten für diese Schäden vor allem die bereits zu diesem Zeitpunkt beobachtete hohe Frequenz von Mutationen der mitochondrialen DNA, die geringe Größe des mitochondrialen Genoms und die (im Vergleich zu nukleärer DNA) fehlenden Reparaturmechanismen verantwortlich[86, 87]. Die Schäden in der mitochondriellen DNA präsentierten sich gewebespezifisch verteilt[128, 137], was auf eine erhöhte Vulnerabilität einzelner Organe schließen ließ. Altersabhängige Akkumulationen von Deletionen der mtDNA, waren zu diesem Zeitpunkt bereits in Geweben verschiedenster Organe von Mensch und Tier entdeckt worden[44, 138-140] und lieferten somit einen starken Hinweis auf eine altersbezogene Assoziation.

Corral-Debrinski und Kollegen konnten schließlich eine signifikante Anzahl von mt-DNA-Deletionen in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns nachweisen[116], und postulierten damit überzeugend, dass Deletionen der mitochondrialen DNA zu einem erheblichen Teil zum Altern des menschlichen Gehirns und der Entwicklung neurodegenerativer Krankheiten beitragen.

Dass in den letzten Jahren mtDNA Deletionen nicht nur in alterndem Gewebe, sondern auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden konnten[108, 117], zeigt eine mögliche Rolle mitochondrialer DNA- Deletionen in der Pathogenese auch der Alzheimer Erkrankung auf.

1.2.4.1 Mitochondriale pathologische Prozesse und die Alzheimer Krankheit

Als Linnane et al. ihre Hypothese von der wichtigen Rolle der mtDNA-Mutationen im Alterungsprozess beschrieben, postulierten sie auch, dass dieselbe Pathogenese auch für degenerative Krankheiten gelten würde[87]. Doch auch wenn mittlerweile die Assoziation von Mutationen der mtDNA und Krankheiten - wie zum Beispiel Neoplasmen und hereditären Syndromen - unbestritten ist[93, 141, 142], so ergeben sich doch Schwierigkeiten, dieselbe Klarheit bezüglich altersassoziierten neurodegenerativen Krankheiten aufzuzeigen. Gerade ihre Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung wird bis jetzt kontrovers diskutiert, hatten doch einige Arbeiten gegensätzliche Ergebnisse gezeigt. Corral-Debrinski et al. demonstrierten zum Beispiel erstmals eine Zunahme der bereits oben erwähnten

„Common-Deletion“ im Gehirn von Alzheimer-Patienten versus gleichaltrigen Kontrollpersonen[143]. Allerdings wurde kurz darauf von Lezza et al. gezeigt, dass Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen im Gegenteil eine niedrigere Rate dieser spezifischen Deletion aufweisen[144]. Andere Arbeiten wiederum konnten überhaupt keinen Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutationen und der Alzheimer-Erkrankung feststellen[145]. In der letzten Zeit jedoch häufen sich die Hinweise, dass eine mitochondriale Dysfunktion auch bei der Alzheimer-Krankheit eine Rolle spielen könnte (einen Überblick bieten folgende Arbeiten:[47, 146-148]). Tatsächlich akkumulieren Proteine wie Amyloid-Precursor-Protein und Amyloid- β -Protein, die mit der Pathogenese von Alzheimer direkt in Zusammenhang gebracht werden, in den Mitochondrien[149], verursachen eine mitochondriale Dysfunktion und beeinträchtigen die Energieproduktion[150, 151]. Komplex IV der Atmungskette (COX) scheint besonders von dieser Dysfunktion betroffen zu sein[152], auch wenn der genaue Mechanismus und die pathophysiologischen Konsequenzen einer COX- Fehlfunktion bezüglich der Alzheimer Krankheit bis jetzt nicht völlig geklärt sind. Immerhin wurde eine Zunahme von COX- defizienten Neuronen im Gehirn von Alzheimer- Patienten beobachtet[153, 154]. Ob allerdings dieses Defizit der COX- Effektivität ein ursächliches Ereignis der Alzheimer-Pathophysiologie ist, wird kontrovers diskutiert[155].

Einen Hinweis auf eine mögliche Rolle der Atmungskette boten die Beobachtungen von erhöhten ROS- Konzentrationen, die beim M. Parkinson und M. Alzheimer immer wieder gefunden wurden [47]. Da die Mitochondrien durch die Atmungskette die Hauptproduzenten von ROS sind [82] und da die mtDNA der Atmungskette direkt benachbart ist, wurden Schäden an der mtDNA schon lange als Ursache für die mitochondriale Dysfunktion bei neurodegenerativen Krankheiten diskutiert [87, 156]. 2006 war es Bender et. al. gelungen, mit quantitativen Methoden in einzelnen Neuronen der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten eine hohe Last an mtDNA-Deletionen nachzuweisen [108]. Dies führte zu der Fragestellung, ob sich ähnliche Ergebnisse auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten - wie zum Beispiel der Alzheimer Erkrankung - finden lassen würden. Hinweise auf die Existenz von mtDNA- Schäden auch bei dieser Krankheit gab es schon lange: außer Corral-Debrinski [143] und Hamblet [157] hatten noch einige andere Gruppen über dementsprechende Veränderungen an der mtDNA berichtet: Coskun et. al fanden Mutationen der mtDNA-Kontrollregion[158] und auch auf Ribonukleinsäure (RNA für „*ribonucleic acid*“)-Level

wurden sowohl im Früh- und Spätstadium von Alzheimer eine Down-Regulation der mitochondrial kodierten Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette beobachtet[159]. Die Deletionslevel, die Corral-Debrinski und Hamblet beschrieben hatten, waren allerdings zu niedrig, um pathologische Folgen nach sich ziehen zu können - muss doch der Anteil der deletierten mtDNA nach der „threshold theory“ mindestens 60% betragen, um pathologisch wirksam zu sein und eine Dysfunktion der Mitochondrien hervorzurufen[104]. Wie aber die Ergebnisse von Bender et. al. bei Parkinson gezeigt haben ist es wichtig, spezifisch krankheitsrelevante Zellpopulationen auf Einzelzellbasis zu untersuchen, um eine akkurate Aussage über die gesamte Deletionslast der neuronalen mtDNA machen zu können. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Laser-Mikro-Dissektion (LMD) verwendet, mit der einzelne Neuronen unter dem Mikroskop ausgeschnitten werden können. Darüber hinaus bietet die Methode der real-time Polymerasekettenreaktion (PCR für **P**olymerase **c**hain **r**eaction, rt-PCR) im Gegensatz zur konventionellen PCR einen vielversprechenden neuen methodischen Ansatz, um die Gesamtdeletionslast einer Zelle gezielt untersuchen zu können - ein bei dem Vorkommen von multiplen unterschiedlichen Deletionen umso gewichtigerer Vorteil.

Da die Methode der quantitativen rt-PCR relativ jung ist und erst seit einigen Jahren breitflächig eingesetzt wird, folgt an dieser Stelle ein kurzer Abriss über die theoretischen Grundlagen dieser Technik.

1.3 Real-time Polymerasekettenreaktion – Einführung und theoretische Grundlagen

Die Methode der quantitativen rt-PCR ermöglicht eine quantitative Abschätzung der zu untersuchenden DNA-Menge und stellt eine Kombination von DNA Amplifikation und optischer Detektion des PCR- Produktes in einem einzigen Reaktionsgefäß dar.

Die Real-time PCR, also die Polymerasekettenreaktion in Echtzeit, wurde in den frühen neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt und entstand aus dem Wunsch heraus, die Amplifikation des entstehenden PCR- Produktes direkt mitverfolgen zu können. Waren die ersten Versuche - deren Gestaltung zunächst aus mehrmaliger Entnahme und Auswertung der Proben zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion bestand[160] - noch von einem hohem

Kontaminationsrisiko geprägt, entwickelten sich bald besser geeignete Methoden. Es entstanden zwei Detektionssysteme, ein nicht-spezifisches und ein spezifisches Detektionssystem. Beide basieren auf Messung der Fluoreszenz verschiedener fluoreszierender Farbstoffe, die der Reaktion zugegeben und vor und nach der Amplifikation gemessen werden. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Aufgrund dieser Tatsache ist somit auch eine Quantifizierung der ursprünglichen DNA möglich.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein spezifisches Detektionssystem benutzt. Das Prinzip des spezifischen Detektionssystems basiert auf der Beobachtung der 5'-3'- Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, über die man indirekte Aussagen über die Zunahme des Amplikons machen kann. Dafür bediente man sich zuerst radioaktiv- markierter Sonden („*probes*“) in Form von Oligonukleotiden, die mit dem Amplikon hybridisieren und von der Taq-Polymerase enzymatisch gespalten werden[161]. Später wurden die radioaktiv markierten Sonden durch Fluorochromfarbstoffe ersetzt[162], die an die Oligonukleotide synthetisiert wurden. Ein Prinzip, dem auch heute noch gefolgt wird, denn: liegen die Oligonukleotide in einem Bereich innerhalb der beiden Primer, ist eine für das Amplifikationsprodukt spezifische Markierung möglich.

Zugrunde liegender Mechanismus der Fluoreszenzemission dieser farbstoffmarkierten Sonden ist der **Fluoreszenz- Resonanz- Energie-Transfer (FRET)**[163]:

Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat ein individuelles Anregungs- und Emissionsspektrum, in dessen Bereich er Energie aufnimmt und wieder abgibt. Wird nun ein Fluoreszenzfarbstoff (F1) mit dem Licht einer Wellenlänge (A1) angeregt, die innerhalb seines Anregungsspektrums liegt, so emittiert er die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1). Wird diesem ersten Fluorochrom (F1) ein zweites (F2) hinzugefügt, dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum des ersten (E1) entspricht, so geschieht folgendes: Die Energie des angeregten F1 wird nicht als E1 abgestrahlt, sondern geht direkt auf F2 über und regt dieses Fluorochrom an. Das angeregte Fluorochrom F2 gibt die so aufgenommene Energie in Form von Licht seines individuell charakteristischen Emissionsspektrums (E2) ab. Dieser Vorgang ist allerdings nur möglich, wenn F1 in ausreichende Nähe zu F2 gebracht wird. Dies entspricht einem Abstand von 17 bis 20 Basen[163].

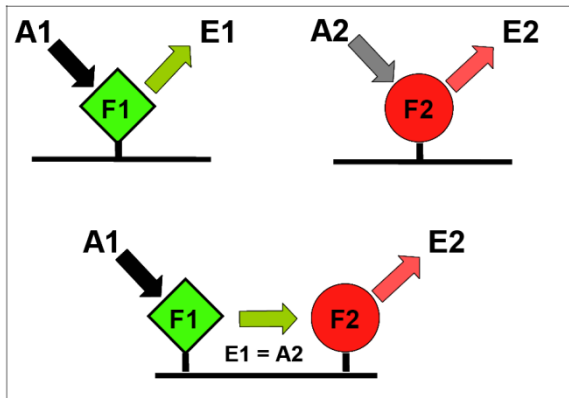


Abbildung 5: Der FRET-Effekt

Fluorochrom 1 (F1) und Fluorochrom 2 (F2) mit ihren jeweils charakteristischen Anregungs- (A1, A2) und Emissionspektren (E1, E2). In diesem besonderen Fall sei $E1=A2$. Wird nun F1 in ausreichende Nähe zu F2 gebracht, so wird die emittierte Energie E1 von F1 auf F2 übertragen. F2 wird angeregt und strahlt die Energie als E2 ab.

Durch die Messung von E1 oder E2 ist es während der laufenden PCR möglich, den ungefähren Abstand der Fluorochrome zu ersehen: misst man E1, so sind sie weiter voneinander entfernt. Laut Definition nennt man F1 in diesem Fall Reporter und F2 Quencher (engl.: *to quench*, auslöschen). Misst man E2, sind sie sich räumlich näher[164], F1 wird in diesem Fall zum Donor (lat.: *donor*, -is, der Gebende), F2 zum Akzeptor (lat.: *acceptor*, -is, der Empfänger).

Ausgehend von dem Prinzip des FRET- Effekts wurden verschiedene Varianten spezifischer Detektionssysteme für die rt-PCR entwickelt. In diesem Rahmen soll jedoch nur auf die so genannten *Double-Dye*-Sonden (engl.: *double*, doppelt; *to dye*, färben) eingegangen werden, deren Möglichkeiten wir uns hier bedienen.

Die Sequenz dieser Oligonukleotide ist mit zwei Fluorochromfarbstoffen versehen, dem Reporter am 5'- und dem Quencher am 3'-Ende. Dort ist zusätzlich noch eine Phosphatgruppe angebracht, um eine eventuelle Fehlfunktion als Primer zu unterbinden[165]. Ist die Sonde intakt, sind die Voraussetzungen für den FRET-Effekt gegeben: Aufgrund der räumlichen Nähe wird die vom Reporterfarbstoff aufgenommene Energie direkt auf den Quencher übertragen und abgestrahlt: gemessen wird fast ausschließlich E2. Die vom Reporter emittierte Energie E1 ist sehr gering[166]. Auch nach der Bindung der Sonde an den komplementären DNA- Strang verändert sich dieser Vorgang nicht[165]. Erst während der

Hydrolysierung der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in der Elongationsphase[162] treten Umstände ein, die den FRET-Effekt unmöglich machen: Der Reporter ist nach der Hydrolyse zu weit vom Quencher entfernt, die vom Reporter abgestrahlte Energie E1 wird nicht mehr in E2 umgewandelt, sondern direkt abgestrahlt. Dieser Anstieg der Fluoreszenz wird gemessen.

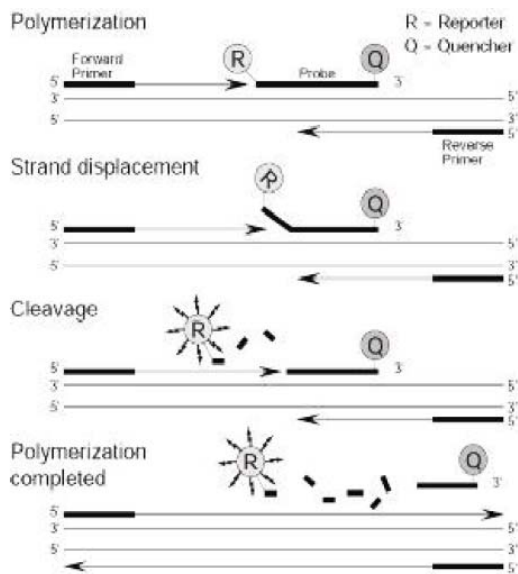


Abbildung 6 [167]: Das Double-Dye-Sonden-Prinzip

Bei intakter Sonde wird die vom Reporter R emittierte Energie E1 vom Quencher Q durch den FRET-Effekt ausgelöscht. Während der Amplifikation ist die für den FRET-Effekt notwendige räumliche Nähe der Sonden durch die Aktivität der Taq-Polymerase nicht mehr gegeben: R emittiert Energie und E1 steigt an.

1.3.1 Technische Grundlagen und Auswertungsmethode der Real-time-PCR

Moderne real-time PCR-Systeme kombinieren in der Regel einen Thermocycler mit einer Lichtquelle- in der Regel bestehend aus Halogenlampen, Laser oder einer Licht emittierenden Diode (LED)- und einem optischen Detektionsmodul. So ist die Amplifikation und gleichzeitige Messung der Fluoreszenz in einem einzigen Reaktionsgefäß möglich, die PCR kann durch graphische Darstellung der Fluoreszenzzunahme in Echtzeit - in „real time“ - beobachtet werden[168]. Für das vorliegende Projekt wurde als rt-PCR-System ein LightCycler des Herstellers Roche verwendet. Dieses System benutzt eine LED als

Lichtquelle und verfügt über einen Anregungsbereich bei 470 nm, sowie einen Detektionsbereich bei 530, 640 und 710 nm.

Wie bereits beschrieben wird das Amplifikationsprodukt mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Sonden gemessen und graphisch dargestellt. Exemplarisch ist in Abbildung 7 die Graphik der Amplifikation einer beliebigen Probe aufgezeichnet, wobei die gemessene Fluoreszenz als Ordinate gegen die Anzahl der Zyklen als Abszisse aufgetragen ist. R bezeichnet die native Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes, die während der Amplifikation gemessen wird, Delta R (dR) diese Fluoreszenz korrigiert um den Wert der Grundfluoreszenz.

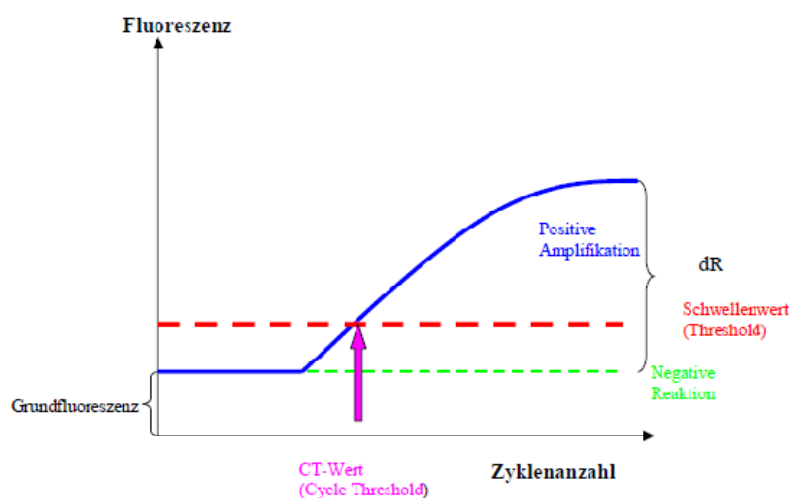


Abbildung 7: Amplifikationsgrafik der quantitativen real-time PCR.

Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen. Dabei lässt sich bereits vor Amplifikation eine gewisse Grundfluoreszenz (grüne Linie, blau markiert) messen. Die rote Threshold-Linie bezeichnet den Schwellenwert (Threshold). Der CT (Cycle Threshold)- Wert bezeichnet den Schnittpunkt des Amplifikationsgraphen mit der Threshold-Linie als Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert. Überschreitet die Fluoreszenz der Proben diesen Wert, spricht man von Amplifikationsprodukt, die Reaktion ist positiv. Hierbei ist dR der Wert der Fluoreszenz des Amplifikationsprodukts, korrigiert um den Wert der Grundfluoreszenz. Verläuft der Graph stets parallel zur Abszisse, ist die Reaktion negativ (grüne Linie). In diesem Fall erfolgte keine Amplifikation.

Wie aus Abbildung 7 zu ersehen, ist die Konzentrationszunahme des Amplifikationsproduktes proportional zum Anstieg der Fluoreszenz. Ungeachtet dessen ist jedoch die Fluoreszenz einer Reaktion niemals gleich null. Fluoreszenzfarbstoffe und Reaktionsgefäße bedingen eine gewisse Grundfluoreszenz. Um den Zeitpunkt zu definieren, von dem ab man von einer

signifikanten Zunahme der Fluoreszenz sprechen kann, wird ein Schwellenwert vorgegeben. Er ist definiert als die Standardabweichung der Grundfluoreszenz, gemessen zwischen Zyklus drei und fünfzehn, multipliziert mit dem Faktor 10, addiert zum Wert der Grundfluoreszenz selbst. Dieser Schwellenwert unterscheidet die gemessene Fluoreszenz einer Probe klar von der Grundfluoreszenz: Überschreitet die gemessene Fluoreszenz eines Amplifikationsproduktes diesen Schwellenwert, verläuft die Reaktion positiv. Der Cycle-Threshold (CT)-Wert, bezeichnet den Zeitpunkt der Reaktion, an dem dieser Schwellenwert überschritten wird. In Abbildung 7 ist er als Schnittpunkt des Amplifikationsgraphen mit der Grundlinie zu erkennen.

Der CT-Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure[169]. Er dient so als Grundlage der Quantifizierung der Reaktion: ist der CT-Wert niedrig, war die Ausgangsmenge an eingesetzter DNA hoch und vice versa.

Wie in der Abbildung 7 ebenfalls zu ersehen, verläuft der Graph des Amplifikationsproduktes während der ersten Zyklen ohne Anstieg parallel zur Abszisse. Wird hier auch grafisch kein Fluoreszenzanstieg verzeichnet, so kommt es dennoch zur Produktsynthese. Das entstehende Produkt ist allerdings so gering, dass es noch keinen Anstieg der Fluoreszenz und noch kein messbares Signal erzeugt. Verläuft der Amplifikationsgraph dauerhaft parallel zur Abszisse, so entsteht kein Amplifikationsprodukt: die Reaktion verläuft negativ – wie es zum Beispiel bei einer zu geringen DNA-Menge der Fall ist.

Die Messung der ansteigenden Fluoreszenz wurde in Echtzeit durchgeführt, das heißt, die Fluoreszenz des Reaktionsproduktes wurde während eines jeden Zyklus während der Elongationsphase gemessen.

Für die Auswertung der Amplifikation bediente man sich der Methode der relativen Quantifizierung in Form der delta-delta-CT($\Delta\Delta\text{CT}$)-Methode. Sie ist eine häufig benutzte Auswertungsmethode der Real-time-PCR und stützt sich auf die Erfassung von Veränderungen eines sich im Gleichgewicht befindenden Systems. Ziel ist die Abschätzung des relativen Verhältnisses der DNA-Menge einer Probe zu der Menge der DNA einer zweiten Probe. Da hier nur ein relatives Verhältnis bestimmt wird, muss weder die Konzentration der Sequenz bekannt sein, noch ist die Erstellung von Standardkurven mit

bekannter Konzentration notwendig[170, 171]. Die Menge der Zielsequenz wird bezogen auf das Signal einer zweiten untersuchten Sequenz semiquantitativ abgeschätzt.

Zu diesem Zweck wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode herangezogen, welche neben der Standardkurvenmethode ein adäquates Verfahren der relativen Genquantifizierung ist[171]. Wie die Berechnung mit Hilfe von Standardkurven, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, benötigt die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode eine interne Kontrolle in Form eines Referenzgens, das ubiquitär und konstant in der DNA der zu untersuchenden Proben enthalten ist. Dieses Gen stellt eine Normalisierung dar, zu der die Menge der DNA des von Deletionen betroffenen Gens ins Verhältnis gesetzt werden kann. Als endogenes Referenzgen diente in dieser Arbeit das mitochondriale Gen für die mitochondriale NADH-Dehydrogenase (mtND1), das später unter Punkt 3.4.6.2. (Auswahl der Gene) näher beschrieben wird. Die zu untersuchenden Proben wurden nach zu untersuchenden Genen aufgeteilt und die Amplifikation von Referenzgen und Ziel-Gen während einer Reaktion in verschiedenen Reaktionsgefäßen untersucht.

Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode basiert auf einen Vergleich der CT- Werte von Ziel-Gen und Referenzgen. Voraussetzung für diese Vergleichbarkeit ist die gleiche Effizienz der abgelaufenen PCR beider Gene[171], die durch die gleichzeitige Amplifikation dieser Gene - entnommen aus der DNA einer gesunden Kontrollperson ohne Deletionen - geprüft wird. Ist diese Voraussetzung gegeben, so gilt für die Berechnung der Quantifizierung folgende Formel:

$$R = 2^{-\Delta\text{CT}}$$

[169]

wobei : R = kalkulierte relative Anzahl der DNA-Kopien

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Referenzgen}} - \text{CT}_{\text{Zielgen}}$$

(nach Subtraktion des ΔCT von dem CT-Wert der DNA aus dem Blut einer gesunden 35-jährigen männlichen Kontrolle ohne mitochondriale Deletionen).

Um die Hypothese zu prüfen, dass Deletionen der mtDNA in die Pathophysiologie bei Alzheimer involviert sind, untersuchten wir mit dieser Methodik die Neuronen dreier verschiedener Gehirnregionen von Alzheimer-Patienten und altersgleichen Kontrollen, nämlich frontaler Kortex (FC), Putamen (Put) und Substantia nigra (SN). Die Methode der rt-PCR nach dem Protokoll von He et al.[172], bietet eine exzellente Möglichkeit, den Anteil deletierter mtDNA in Einzelzellen festzustellen. Erwartungsgemäß sollte die Verteilung der mtDNA- Deletionen bei Alzheimer- Patienten am meisten den frontalen Kortex betreffen und somit der anatomischen Verteilung der neuropathologischen Veränderungen folgen.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Zusammengefasst lässt sich für diese Arbeit folgende Fragestellung formulieren:

Wie bereits ausgeführt, bieten die bisher erhobenen Daten und Erkenntnisse eine gute Grundlage für die Annahme, dass mtDNA-Deletionen eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten spielen. Insbesondere könnte dies auch für die Alzheimer-Krankheit zutreffen. Mit dieser Arbeit soll die Hypothese überprüft werden, dass mtDNA-Deletionen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten vor allem in den Regionen akkumulieren, die von dieser Erkrankung neuropathologisch am meisten betroffen sind.

Da Studien mit ähnlicher Fragestellung bisher nur widersprüchliche oder nicht zufriedenstellende Ergebnisse vorweisen konnten, versuchen wir, mit veränderter Methodik eindeutigere Daten zu erhalten. Dies stellt sich wie folgt dar:

1. Untersuchung dreier Regionen des menschlichen Gehirns von Alzheimer- Patienten und gleichaltrigen Kontrollen: frontaler Kortex (FC), Substantia nigra (SN) und Putamen (Put). Erwartungsgemäß sollten sich mtDNA-Deletionen am meisten im FC ansammeln, da dieses Gehirnareal besonders von neuropathologischen Veränderungen bei der Alzheimer-Erkrankung betroffen ist.

2. Untersuchung von einzelnen Neuronen der entsprechenden Areale mit Hilfe eines Lasermikrodissektionsgerätes nach selektiver Färbung der Zellen. Diese Methode verspricht ein besseres Ergebnis als die Untersuchung von Gewebshomogenat, da es hiermit möglich ist, selektiv einzelne Neurone zu untersuchen, die bei der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen. Somit bietet sich die Möglichkeit, die tatsächliche Deletionslast ausgewählter Neurone zu messen - während bei der herkömmlichen Homogenatsuntersuchung immer auch die mtDNA u.a. der Gliazellen mitausgewertet wird. Ein „Verwässerungseffekt“ wird somit weitestgehend vermieden.

3. Relative Quantifizierung der mitochondrialen DNA der Einzelneurone durch rt-PCR. Die angewendete Methode erlaubt die Quantifizierung der Gesamtdeletionsbelastung unabhängig von der Kenntnis der einzelnen Deletionsart (Lokalisation der Break-Points und Größe der Deletionen).

3 Materialien und Methoden

3.1 Gewebeproben

Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebeproben aus humanem Gehirn untersucht. Die untersuchten Regionen bestanden aus dem Frontalem Kortex, der Substantia nigra pars compacta und dem Putamen.

Besagte Proben wurden über die Deutsche Hirnbank Brainnet® bezogen und stammen aus den pathologischen Instituten der Universitäten Aachen, Leipzig, München, Münster, Tübingen und Würzburg. Bis zur Weiterverarbeitung in Form von kryostatischen Dünnschnitten wurden die Gewebeproben bei -80°C in verschlossenen Behältern gelagert.

3.2 Chemikalien für die weitere Analyse und Quantifizierung

Im Folgenden findet sich eine Auflistung aller verwendeten Chemikalien der einzelnen Arbeitsschritte mit Bezeichnung, Produktnummer oder näherer Bezeichnung und Hersteller. Eine genaue Beschreibung der Zubereitung der Puffer und Lösungen für Färbung, DNA-Extraktion und rt-PCR findet sich unter der ausführlichen Beschreibung der entsprechenden Methode.

3.2.1 Chemikalien für die Kryokonservierung der Gewebe in Form von Gefrierdünnschnitten

Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Chemikalien für die Anfertigung der Gefrierdünnschnitte. Weitere Geräte sind unter 3.3.1. (Geräte und Hilfsmittel für die Kryokonservierung der Gewebe in Form von Gefrierdünnschnitten) aufgelistet.

Tabelle 1: Verzeichnis der Chemikalien für die Kryodünnschnitte

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Tissue-Tek® O.C.T. Compound Gefriereinbettmedium	020108926	Jung/ Reichert Leica, Wetzlar, Deutschland

3.2.2 Chemikalien für die Färbung nach Nissl

Tabelle 2 führt die Chemikalien für die Färbung der Neurone nach Nissl auf.

Tabelle 2: Verzeichnis der Chemikalien für die Färbung nach Nissl

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Cresylviolett	105235	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCL 1 mol/l	109057	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH 1 mol/l	109137	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100% Emplura	818760	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisessig 100%	100066	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Histoclear	HS-200	National-Diagnostics, Atlanta, USA

3.2.3 Chemikalien für die DNA-Extraktion der dissezierten Neurone

In Tabelle 3 sind alle Chemikalien der anschließenden DNA- Extraktion aus den dissezierten Zellen aufgeführt.

Tabelle 3: Verzeichnis der Chemikalien für die Extraktion der mt-DNA der dissezierten Neurone

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
LiChrosolv dH ₂ O für die Chromatographie	115333	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
QIAmp Micro Kit	56304	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100% Emplura	818760	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland

3.2.4 Chemikalien für die Quantifizierung der mtDNA-Deletionen durch Real-time-PCR

Die Chemikalien für die rt-PCR zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 4: Verzeichnis der Chemikalien für die rt-PCR

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
TaqMan Core Reagent Kit	N808-0228	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ultrapure BSA, non acetylated, 50 mg/ ml	AM2616	Ambion (Ltd.), Cambridgeshire, UK
Primer:	L_ND4_L12087 H_ND4_H12170 L_ND1_L3485 H_ND1_H3532	MWG-Biotech Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

TaqMan® TAMRA Probes	450025	Applied Biosystems, Foster City, USA
----------------------	--------	--------------------------------------

Das ausführliche Protokoll der rt-PCR folgt unter Punkt 3.4.6. (Quantitative real-time PCR).

3.3 Geräte und Software der weiteren Analyse und Quantifizierung

In den nachfolgenden Tabellen sind die Geräte, Hilfsmittel und Software für die einzelnen Arbeitsschritte der weiteren Analyse und Quantifizierung (Herstellung der kryostatischen Gefrierdünnschnitte, Färbung der Neurone nach Nissl, Lasermikrodissektion, Extraktion der DNA aus den dissezierten Neuronen, Quantifizierung der mtDNA-Deletionen durch Real-time-PCR) aufgelistet. Die Angabe erfolgt wie oben mit Bezeichnung des Gerätes, Produktnummer oder näherer Spezifizierung, sowie Hersteller.

3.3.1 Geräte und Hilfsmittel für die Kryokonservierung der Gewebe in Form von Gefrierdünnschnitten

In Tabelle 5 finden sich die für die Herstellung der Gefrierdünnschnitte verwendeten Geräte:

Tabelle 5: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel der Kryokonservierung

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Mikrotom Kryostat	CM 3050	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Disposable microtome blades 818	865052	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Objektträger Super Frost®	03-0060	R. Langenbrinck

Plus		Microm, Walldorf, Deutschland
MembraneSlides PEN- Membrane, 2,0 µm	11505158	MicroDissect GmbH, Herborn, Deutschland; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kryodesinfektionsmittel Cryofect	038742801	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Parafilm M®	701606	Brand, Wertheim, Deutschland

3.3.2 Geräte und Hilfsmittel für die Färbung der Neurone nach Nissl

Hilfsmittel für die Nissl- Färbung der Neurone:

Tabelle 6: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die Färbung nach Nissl

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Digital pH-Meter	7410	Knick, Berlin, Deutschland
Heizplatte und Magnetrührer	COMBI IKAMAG RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Glaspipetten 5 ml DIN EN ISO 385	27711	Brand, Wertheim, Deutschland
Glaspipetten 10 ml DIN EN ISO 385	27712	Brand, Wertheim, Deutschland

Präzisionswaage	Precisa 205 A SCS	Precisa, Milton Keynes, UK Swiss Quality, Zürich, Schweiz
DAKO- Pen	S 2002	DAKO, Carpinteria, USA

3.3.3 Geräte und Hilfsmittel für die Lasermikrodissektion der gefärbten Neurone

Tabelle 7 gibt die zur Dissektion der Einzelzellen verwendeten Geräte und Software wieder:

Tabelle 7: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die Lasermikrodissektion

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Laser Capture Microdissektion AS/LMD®	Leica LMD 6000	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
LMD- Bedienungssoftware	Software Leica Image Manager IM 1000 for windows NT 4.0	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
PCR- Softtubes, 0,2 ml, steril	711615	Biozym, Oldendorf, Deutschland

3.3.4 Geräte und Hilfsmittel für die DNA- Extraktion der dissezierten Neurone

Materialien zur Extraktion der mtDNA sind in Tabelle 8 aufgetragen:

Tabelle 8: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die Extraktion der mt-DNA

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Centrifuge 5415 R	5426 000 018	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Vortex-Genie® 2	SI-0256	Scientific Industries, New York, USA
Reaktionsgefäß 3810	0030 102 002	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Dampsterilisator Varioklav 400 EH	48460395	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland

3.3.5 Geräte und Hilfsmittel für die Quantifizierung der mtDNA-Deletionen durch Real- Time PCR

In Tabelle 9 sind die für die rt-PCR benötigten Geräte und Software aufgeführt:

Tabelle 9: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die rt-PCR

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Aura PCR Kabinett E7922	PC10000	Bio Air Instruments, Mailand, Italien
Pipetman® Pipette 1-10 µl	F144802	Gilson, Inc., Middleton, USA

Pipetman® Pipette 2-20 µl	F123600	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetman® Pipette 50-200 µl	F123601	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipettenspitzen, steril, DNase-, RNase-, pyrogenfrei SafeSeal-Tip Premium 10 µl	693010	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Pipettenpspitzen, steril, DNase-, RNase-, pyrogenfrei SafeSeal Tip Premium 20 µl	692050	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, steril, DNase-, RNase-, pyrogenfrei SafeSeal Tip Premium 200 µl	692069	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Zentrifuge Biofuge Fresco	75005521	Heraeus, Hanau, Deutschland DJB Labcare Limited, Newprot Pagnell, Buckinghamshire, UK
Real-Time PCR System Light-Cycler® 1.5	04484495001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCyclerCapillaries 20 µl	11909339001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler Centrifuge Adapters with Cooling Block	11909312001	Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler Relative Quantification Software 3.5.3	03158527001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler Capillary	03603920001	Roche, Diagnostics GmbH,

Releaser		Mannheim, Deutschland
Vortex Mixer ZX ³	F20220176	VELP® Scientifica, Meiland, Italien
Personalcomputer	Standard- Computer	Fujitsu- Siemens
Liebherr Premium Kühlgerät		Liebherr-International GmbH, Biberach a.d. Riss, Deutschland

3.3.6 Geräte und Software für die statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Geräte und deren Software verwendet:

Tabelle 10: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die statistische Auswertung

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Personalcomputer	Standard-PC	Fujitsu- Siemens
Microsoft Office Excel 2003		Microsoft
SPSS für Windows, 12.0		SPSS Inc., IBM Company Headquarters, Chicago

3.4 Methoden

3.4.1 Humane Gewebeproben

3.4.1.1 Auswahl der Zielregionen

Um ein eventuell auftretendes krankheitsspezifisches Muster mitochondrialer Deletionen festzustellen, wurde besonderes Augenmerk auf die Auswahl der entsprechenden Gehirnregionen gelegt. Anfangs erst im Hippokampus und Locus coeruleus gelegen, treten die histopathologischen Veränderungen mit zunehmender Krankheitsdauer von M. Alzheimer gehäuft im frontalen Kortex auf[17]. Entsprechend dieser Manifestation der Alzheimer-Krankheit im humanen Zentralnervensystem wurden Proben aus dem FC verwendet. Da bereits in früheren Studien bei Parkinsonpatienten im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen eine wesentlich höhere Deletionslast der mtDNA in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns festgestellt wurde[108, 117], wurde die SN pars compacta für einen direkten Vergleich ebenfalls als zu untersuchende Region ausgewählt. Zusätzlich wurde das Putamen untersucht, das als Struktur der Basalganglien bei Parkinsonpatienten ebenfalls von neurodegenerativen Veränderungen betroffen ist[173].

3.4.1.2 Auswahlkriterien der Gewebespende

Unsere Arbeit wurde nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt, in der der Weltärztebund die Maßgaben für medizinische Forschung am Menschen festlegte und von der lokalen Ethikkommission der Universität München genehmigt. Sowohl der Bezug der Gewebe, als auch die nachfolgende Methodik war in diese Genehmigung eingeschlossen.

Die Gewebeproben wurden sämtlich von der deutschen Gehirnbank Brainnet® bezogen. Als Auswahlkriterium für die Verwendung der Gewebe wurden die neuropathologischen Standards nach Braak herangezogen[17]. Braak teilt die histopathologischen Veränderungen bei der Alzheimer-Krankheit je nach Auftreten und Verteilungsmuster der Alzheimerfibrillen

und Neuropilfäden in insgesamt sechs Stadien ein. Konkret unterscheidet er ein entorhinales Stadium (I/II), ein limbisches Stadium (III/IV) und ein neokortikales Stadium (V/VI). Für die Alzheimerkohorte (n=8; Tab.11) wurden nur Gewebe mit einem kortikalen Braak-Stadium V oder VI verwendet. Da hier definitionsgemäß zahlreiche neuritische Plaques und neurofibrilläre Veränderungen im Neokortex zu finden sind, garantiert dieses Staging im Rahmen dieses Projekts eine Untersuchung von Gewebe schwer betroffener Patienten mit histopathologischen Veränderungen im frontalen Kortex.[17]

Die Kontrollgewebe (Tab. 11) stammten von Patienten (n=9), die weder anamnestisch noch histologisch Hinweise auf eine neurodegenerative Erkrankung boten.

Tabelle 11: Verzeichnis der Gewebe von Alzheimerkohorte und Kontrollgruppe

Gewebe der Alzheimerkohorte und Kontrollgruppe mit Alter bei Todeseintritt, sowie Post-Mortem-Intervall und Braak-Stadium.

Nr.	Gruppe	Alter/Geschlecht	Post-mortem-Intervall (h)	Braak-Stadium
1	Kontrolle	68/männlich	51	Keines
2	Kontrolle	74/männlich	40	Keines
3	Kontrolle	78/weiblich	42	Keines
4	Kontrolle	69/männlich	18	Keines
5	Kontrolle	67/männlich	14	Keines
6	Kontrolle	63/männlich	17	Keines
7	Kontrolle	69/weiblich	38	Keines
8	Kontrolle	83/weiblich	39	V/VI
9	Alzheimer	73/weiblich	36	V/VI
10	Alzheimer	75/weiblich	47	V/VI

11	Alzheimer	67/männlich	47	V/VI
12	Alzheimer	80/weiblich	40	V/VI
13	Alzheimer	86/männlich	42	V/VI
14	Alzheimer	78/männlich	36	V/VI
15	Alzheimer	63/weiblich	28	V/VI
16	Alzheimer	89/männlich	20	V/VI
17	Alzheimer	75/ männlich	48	V/VI

Die Liegezeit post mortem (pm) bis zur Entnahme der Gewebe variierte zwischen 16 und 51 Stunden und entsprechen damit den hier üblichen Zeiten vom Eintritt des Todes bis zur Obduktion. Die Daten bezüglich des pm-Intervalls, sowie des Braak-Stagings stützen sich auf die Angaben der entsprechenden pathologischen Institute.

Insgesamt ergibt sich folgende Aufteilung für Anzahl, Alter und pm-Intervall bis zur Konservierung (in Tabelle 12 aufgetragen sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung):

Tabelle 12: Patienten- und Kontrollgruppe: Anzahl, Alter und Post-Mortem-Intervall

Zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ergab sich im T-Test kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Alter und Post-Mortem-Intervall ($p > 0,05$).

	Alzheimer-Patienten	Kontrollen
Anzahl der Patienten	9	8
Alter	76.9+/- 7.98	72+/- 5.4
Post-Mortem-Intervall	35 +/- 11.45	32+/- 14.35

3.4.1.3 Aufbewahrung und Vorbehandlung der Gewebe vor der weiteren Untersuchung

Alle Regionen wurden von Mitarbeitern der entsprechenden pathologischen Institute entnommen und verarbeitet. Für weitere Informationen hierzu sei an dieser Stelle auf die Richtlinien von Brainnet® verwiesen[174].

Die erwünschten Gehirnregionen wurden tiefgekühlt auf Trockeneis bezogen und nach Erhalt sofort ohne Unterbrechung der Kühlkette bei -80°C aufbewahrt.

3.4.2 Kryostatische Konservierung in Form von Gefrierdünnsschnitten

Zur Herstellung der Gefrierdünnsschnitte wurden die tiefgefrorenen Gewebe hierfür auf Trockeneis zum Kryostaten (Leica) transportiert und sofort ohne Unterbrechung der Kühlkette mit entsprechend vortemperierten Pinzetten in die Kühlkammer des Kryostaten gelegt. Es folgten die vollständige Einbettung in das Einbettmedium Tissue Tek (Leica) und das Auffrieren auf die Objekthalterung. Nach einer mindestens dreißigminütigen Wartezeit, um Artefakte zu vermeiden und eine optimale Angleichung der Gewebstemperatur an die Temperatur des Kryostaten zu ermöglichen, wurde mit dem Schneiden der Gefrierdünnsschnitte begonnen.

3.4.2.1 Einstellungen des Kryostaten und Verifizierung der Gehirnregion

Die Temperatur der Kühlkammer betrug -20°C. Das Messer (Leica) wurde auf eine Schnittdicke von 20 µm eingestellt.

Nach Anschneiden der Gewebeproben wurden einzelne Schnitte mit Glasobjektträgern aufgenommen und mikroskopisch auf die Zielregion untersucht. Exemplarisch sei hier die SN genannt: Erst wenn im Mikroskop das Zellband der (auch im ungefärbten Zustand exzellent sichtbaren) melaninhaltigen Neurone erkennbar war, wurde das Procedere fortgesetzt. War

die gewünschte Region bereits eindeutig makroskopisch erkennbar, wie zum Beispiel beim FC der Fall, so wurde dennoch nicht auf die mikroskopische Verifizierung verzichtet. Nach Aufnahme des Gewebes auf Glasobjektträger wurde mittels Nissl-Färbung das Vorhandensein von Neuronen der gewünschten Schicht mikroskopisch bestätigt. Erst dann wurden die frischen Schnitte auf den Membranobjektträger für die anschließende LMD aufgenommen.

3.4.2.2 Anfertigen der Gefrierschnitte

Von jeder Region der Alzheimer Kohorte und Kontrollgruppe wurde eine Serie, bestehend aus 25 Schnitten, hergestellt. Die Schnittdicke betrug 20 µm. Die frischen Schnitte wurden auf SuperFrost Glasobjektträger aufgebracht. Um eine möglichst große Anzahl unterschiedlicher Neurone zu erhalten, wurde nur jeder fünfte Schnitt auf einen Membranobjektträger (Leica) aufgetragen.

3.4.2.3 Aufbewahrung der Gefrierdünnschnitte

Um Gefrierartefakte in dem empfindlichen zerebralen Gewebe zu vermeiden, wurden die frischen Schnitte bei Raumtemperatur zwei Stunden getrocknet. Danach erfolgte die Aufbewahrung in durch Parafilm luftdicht verschlossenen Behältern bei -80°C.

3.4.3 Färbung der Neurone nach Nissl

Zur Anfärbung der Zielneurone wurde in der vorliegenden Arbeit die Färbung nach F. Nissl[175] verwendet, eines der ältesten und stabilsten Verfahren zur Detektion von Nervenzellen. Das Prinzip beruht auf der Färbung der sogenannten „Nissl-Schollen“[176], deren Vorkommen charakteristisch für Neurone ist und deren basophile Struktur rauem endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen entspricht.

Da diese Färbung keine Schäden der DNA bedingt und darüber hinaus als etablierte Methode zur Quantifizierung der Neuronenanzahl bestätigt wurde [177, 178], stellte sie sich hier als das am Besten geeignete Medium heraus, mit dem die Neuronen im Gefrierdünnchnitt sicher erkannt werden konnten. Die Nissl-Färbung erfüllt somit die wesentlichen Ansprüche für diese Arbeit: eine genaue Wiedergabe der Zellmorphologie um die Zellen zweifelsfrei identifizieren zu können, ohne jedoch die Deletionslast der Neurone durch eine Schädigung der mtDNA zu verändern oder die Effizienz der rt-PCR zu beeinträchtigen.

3.4.3.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte für die Färbung nach Nissl

Für die Färbung wurden die tief gefrorenen Gewebeschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut. Um dies möglichst schonend zu gewährleisten erfolgte der Auftauprozess die erste Stunde lang noch luftdicht mit Parafilm verschlossen. Weitere 30 Minuten trockneten die Schnitte an der Luft. Erst nach mindestens 90 Minuten Liegezeit bei Raumtemperatur wurde mit der Färbung begonnen.

3.4.3.2 Vorbereitung der Puffer und Lösungen

Die Herstellung der für die Färbung essentiellen Puffer und Lösungen (Natrium-Acetat-Puffer, Acid-Alkohol und Cresylviolettlösung) gestaltete sich wie folgt:

Natrium- Acetat- Puffer:

Für diesen Puffer wurden 24 ml einer 0,2M Natrium-Acetat- Lösung zu 176 ml einer 0,2M Essigsäure gegeben. Von dieser mittels Magnetprüher vermischten Lösung wurden mit einer Glaspipette 11,4 ml entnommen und 1000 ml destillierten Wassers hinzugefügt. Diese Mischung wurde wiederum mit einem Magnetprüher sorgfältig verrührt, der pH-Wert genau kontrolliert und bei Abweichen vom Sollwert (3,8) korrigiert.

Cresylviolett-Lösung:

In 100 ml des oben beschriebenen Natrium-Acetat-Puffers wurden 0,1 g Cresylviolett gelöst. Der Soll- pH-Wert 3,8 wurde beständig kontrolliert und falls erforderlich mit NaOH oder HCL korrigiert. Die Lösung wurde anschließend zwei Stunden lang per Magnetrührer gerührt, um eine möglichst vollständige Lösung der Cresylviolettartikel zu gewährleisten. Die sorgfältig vermischte Cresylviolett- Lösung wurde dann durch einen Filter in ein verschließbares Gefäß passiert, so dass eventuell nicht gelöste Partikel nicht in die Färbelösung gelangen konnten. Die Aufbewahrung erfolgte im verschlossenen Gefäß bei 4°C.

Acid-Alkohol:

96 ml 100% Ethanol wurden 4 ml dH₂O mit einer Glaspipette hinzu pipettiert. Unter beständigem Rühren mit dem Magnetrührer wurden dieser Mischung 1 ml Eisessig 100% hinzugefügt.

3.4.3.3 Färbeprotokoll der Neuronenfärbung nach Nissl

Für die Nissl- Färbung wurde auf ein institutseigenes Protokoll zurückgegriffen, das sich im Hause schon seit langem zur Diagnostik bewährt hat:

Nach dem oben beschriebenen Auftauprozess von mindestens 90 Minuten Dauer wurden die Membranobjektträger auf eine ebene, nicht abschüssige Fläche verbracht. Die dünnen Gewebsschnitte auf der Membran wurden vorsichtig mit einem Fettstift umrandet, um ein Abtropfen der Färbelösung auf eine Seite zu vermeiden. So konnte sichergestellt werden, dass der gesamte Gewebeschnitt der gleichen Färbeintensität ausgesetzt war.

Mit einer 1000 µl-Pipette wurde dann die Cresylviolett-Lösung direkt auf die Gewebeschnitte aufgetragen, wobei sowohl darauf geachtet wurde, den gesamten Gewebeschnitt völlig zu bedecken, als auch das Gewebe nicht zu verletzen. Die Färbung wurde für 20 Minuten auf den Schnitten belassen.

Nach dieser Einwirkzeit erfolgte eine kurze Waschung in destilliertem Wasser (dH₂O). Danach wurden die gefärbten Schnitte für 5 Sekunden in ein Bad aus Acid-Alkohol getaucht, um die Überfärbung zu reduzieren. Es schloss sich eine abschließende Differenzierung in unvergälltem 100% Ethanol an.

3.4.3.4 Nachbehandlung und weitere Aufbewahrung der gefärbten Schnitte

Nach beschriebener Differenzierung und zweistündiger Lufttrocknung wurden die Schnitte wiederum in mit Parafilm luftdicht verschlossenen Behältern bei -80°C aufbewahrt.

3.4.4 Lasermikrodissektion

Als eine relativ neue Methode ist die LMD in der Lage, kleinste Bereiche eines Gewebes in Zellgröße zu schneiden und zu separieren. Ein Lasermikrodissektionsgerät besteht in der Regel aus einem Mikroskop, dem Laser und einer spezifischen Steuerungssoftware, mit deren Hilfe das Zielgewebe markiert und bearbeitet werden kann.

Die enorme Präzision dieses Verfahrens wird durch den Einsatz eines Lasers - in diesem Fall ein Diodenlaser mit 355 Nanometer (nm) Wellenlänge - erreicht, der auf das Gewebe 4 Nanosekunden (ns) kurze kohärente Lichtimpulse abgibt. Das Gewebe muss dazu auf einen speziellen Membranobjektträger aufgebracht werden, der das Schneiden von Gewebe zulässt und mit der späteren Analyse nicht interferiert. Das Gewebe wird nun unter dem Mikroskop des Lasers begutachtet und die gewünschte Schnittlinie wird mittels der Bildbearbeitungssoftware am Computer markiert. Die markierten Linien werden dann durch den Laser aus dem Gewebsverbund herausgelöst, indem viele kurze Lichtimpulse aneinandergereiht werden. Das im Fokus des Laserstrahls liegende Gewebe wird durch die entstehende Wärme zerstört, das dem Strahl benachbarte Gewebe jedoch bleibt durch die enorme Kürze der Impulse unbeeinträchtigt. Dieser Umstand folgt dem Prinzip der kalten photoablativen Dekomposition[179], das auch in der Mikrochirurgie Anwendung findet.

Die so separierten Gewebesteile fallen der Schwerkraft gemäß zusammen mit der Trägermembran in den Deckel eines sterilen Gefäßes, das in einer Halterung unter der Membran angebracht ist. Sie können nun weiterverarbeitet werden. Schematisch ist das Prinzip der LMD in folgender Grafik (Abbildung 8) dargestellt:

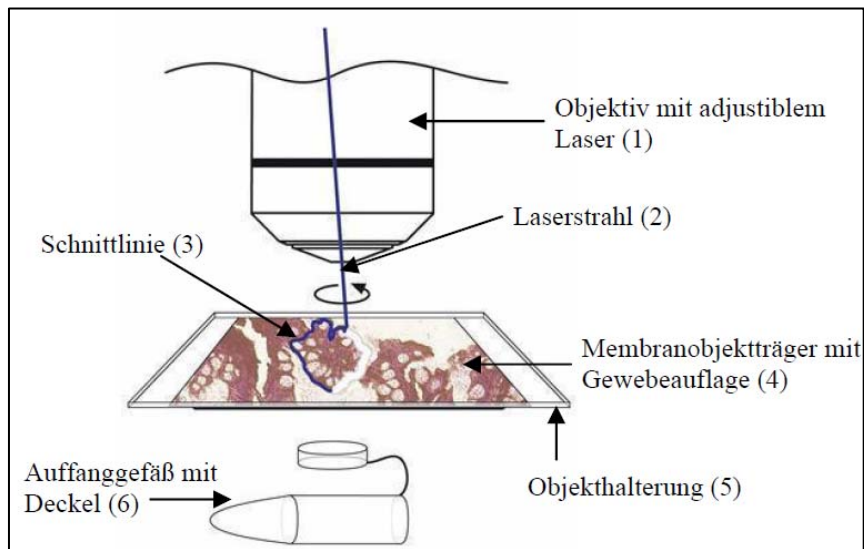


Abbildung 8 [180]: Schematisches Prinzip der Lasermikrodissektion.

Der Laserstrahl (2) wird durch das Objektiv (1) auf das Gewebe geleitet, das auf den Membranobjektträger (4) aufgebracht wurde. Er ist in der Objekthalterung (5) befestigt. Die Schnittlinie (3) folgt der Markierung, die mit Hilfe der Steuerungssoftware digital auf dem mikroskopisch vergrößerten Gewebe angebracht wurde (im Bild nicht sichtbar). Die ausgeschnittene Struktur fällt nun in den Deckel des Auffanggefäßes (6), das unter der Objekthalterung befestigt ist. Nach der Dissektion wird dieses Gefäß schonend entnommen und der Deckel geschlossen. Das ausgeschnittene Material verbleibt im Auffanggefäß.

Die Lasermikrodissektion der Neurone wurde mit einem Mikrodissektionslaser LMD 6000 (355 nm Wellenlänge) vorgenommen. Mit diesem Diodenlaser ist ein Schneidefokussdurchmesser von unter 1 Mikrometer (μm) möglich. Außerdem werden durch die hohe Pulsfrequenz besonders präzise Schnitte ermöglicht. Als Software für das Mikroskop am Computer wurde der Image Manager 1000, ebenfalls von Leica eingesetzt. Einen optischen Eindruck eines solchen Gerätes bietet Abbildung 9.

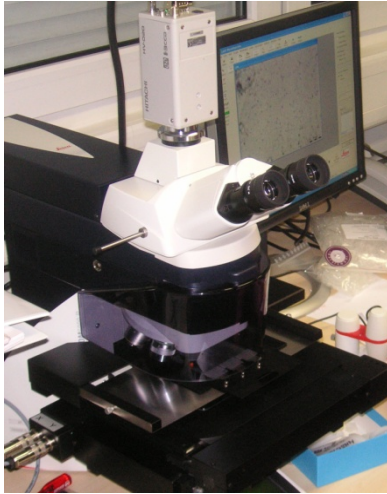


Abbildung 9: Lasermikrodissektionsgerät von Leica.

Rechts oben im Bild der Bildschirm des angeschlossenen PC's. Mit Hilfe der Steuerungssoftware können hier die ausgewählten Strukturen markiert werden. Der Laserstrahl schneidet dann entlang der Markierungslinie.

3.4.4.1 Technische Einstellungen

Zur ersten Orientierung über die Anatomie der vorliegenden Gehirnregion wurde die niedrigste mikroskopische Vergrößerung (4x) des Lasermikrodissektionsgerätes benutzt. Nach Aufsuchen der gewünschten Regionen wurde bei 63-facher Vergrößerung geschnitten. Die Neuronen wurden mit den folgenden Einstellungen dissektiert:

Power: 60 Speed: 14 Specimen Balance: 35 Offset: 30

Diese Einstellungen hatten sich nach mehreren Vorversuchen bewährt. Hier wurde eine maximale Dissektionskraft bei optimaler Präzision erreicht, ohne das umliegende Gewebe stark zu schädigen.

Vor jeder Benutzung wurde der Laser auf der Membran des entsprechenden Objektträgers bei 63-facher Vergrößerung kalibriert und geeicht. Bei der Kalibrierung wurde ein Stück der Membran verwendet, das nicht von Gewebe bedeckt war. Die Tube mit den bei der Kalibrierung entstandenen Membranstücken wurde entsorgt. Die Dissektion fand stets im geschlossenen Raum unter möglichst sterilen Bedingungen statt.

3.4.4.2 Mikroskopische Begutachtung und Auswahl der Zielneurone

Die gefärbten Schnitte wurden auf Membranobjektträger in der Halterung montiert, wobei die membranseitige Oberfläche nach unten zu liegen kam. Daraufhin wurden sie unter dem Mikroskop des Mikrodissektionsgerätes begutachtet.

Bei den Neuronen des FC wurde versucht, ausschließlich Neurone aus den Pyramidenzellschichten III und V zu dissezieren. War eine Unterscheidung der Schichten nicht möglich, wurde darauf geachtet, nur durch ihre Form und Größe eindeutig identifizierbare Zellen auszuwählen. Bei den exemplarisch gezeigte Abbildungen unserer Gewebe ist anzumerken, dass durch die Verwendung von Membranobjektträgern die Bildqualität nicht der eines Glasobjektträgers entspricht.

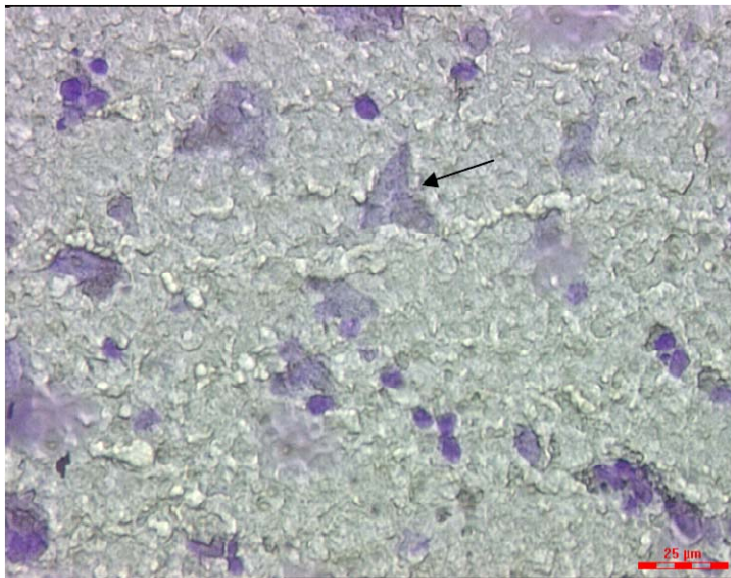


Abbildung 10: Gewebeprobe FC in 40-facher Vergrößerung.

Durch die Verwendung eines Membranobjektträgers entspricht die Bildqualität nicht der eines Glasobjektträgers, man erkennt jedoch mittig im Bild deutlich eine durch die Nissl-Färbung violett erscheinende Pyramidenzelle (markiert durch schwarzen Pfeil), deren Morphologie die typische Pyramidenform aufweist. Die kleinen runden Zellen sind morphologisch nicht eindeutig zu Gliazellen oder Neuronen zuzuordnen und wurden nicht zur Dissektion ausgewählt.

Bei den Geweben der SN wurde das dieser Region eigene Zellband unter dem Mikroskop aufgesucht. Nur Melaninhaltige Zellen aus diesem Zellband wurden verwendet. Ebenso wurde darauf geachtet, nur eindeutig angefärbte melaninhaltige Zellen zu schneiden, um die Auswahl freien Melanins zu vermeiden. So konnten trotz Verzicht auf immunhistochemische Verfahren nur melaninhaltige Substantia nigra – Neurone sicher identifiziert und ausgewählt werden.

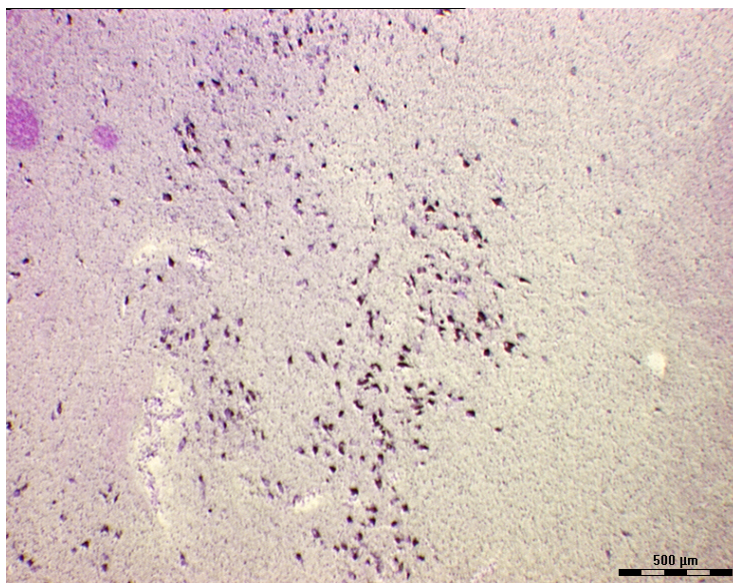


Abbildung 11: Gewebeprobe SN, 6-fache Vergrößerung.

In dieser orientierenden Übersicht lässt sich das typische Zellband der melaninhaltigen Neuronen gut erkennen.

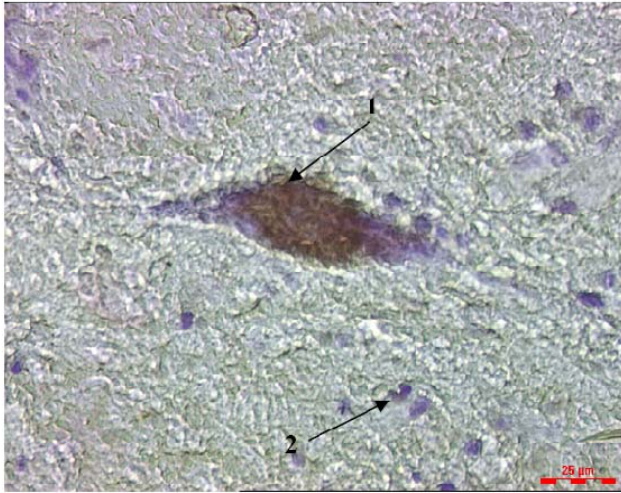


Abbildung 12: Gewebeprobe, Substantia nigra, 63-fache Vergrößerung.

Hier stellt sich ein melaninhaltiges Neuron der SN dar (1). Das Melanin erscheint braun, die violetten Strukturen links und rechts davon sind die „Nissl-Schollen“ (endoplasmatisches Retikulum) des Neurons. Im unteren Teil ist eine Gliazelle zur erkennen (2).

3.4.4.3 Dissektion der Zielneurone

Nach der Auswahl wurden die Zielneurone mithilfe der Steuerungssoftware markiert und einzeln bei 63-facher Vergrößerung geschnitten. Bei der Eichung des Lasers wurde auf einen genügend großen Sicherheitsabstand Wert gelegt, um wertvolles Zellgewebe nicht zu verbrennen. Ebenso wurde jedoch genau darauf geachtet, in diesen Sicherheitsabstand keine anderen Zellen mit einzubeziehen, um nur die DNA dieser einen Zielzelle zu erhalten. Zellen, bei denen die Einhaltung des Sicherheitsabstandes unter diesem Aspekt nicht möglich war, wurden nicht ausgewählt.

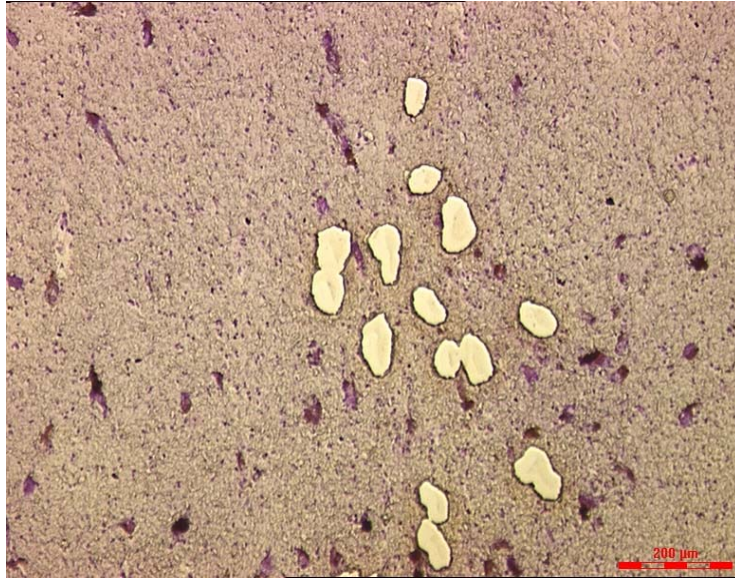


Abbildung 13: Gewebeprobe SN nach Dissektion in 20- facher Vergrößerung.

Die Residuen der dissektierten Neuronen lassen sich gut vom umgebenden Gewebe abgrenzen. Gut erkennbar ist hier die Präzision, mit der die ausgewählten Neurone disseziert werden konnten. Das die Dissektionsstellen umgebende Gewebe wird durch den fokussierten Laserstrahl nicht in Mitleidenschaft gezogen.

Als Sammelbehälter dienten DNase freie, sterile 0,2 ml PCR – Gefäße (Biozym). In zwei Cups wurden jeweils 30 Zellen einer einzigen Region zusammengefasst, fünf Gefäße wurden mit Einzelneuronen bestückt. Die separierten Zellen fielen nach dem Schneidevorgang entsprechend der Schwerkraft direkt in den Deckel des entsprechenden Auffanggefäßes unterhalb der Membran des Objektträgers.

Vor Benutzung der sterilen Cups wurde per Mikroskop mit verschiedenen Vergrößerungen jedes Gefäß mit Deckel auf Verunreinigungen untersucht und gegebenenfalls verworfen. Nach dem Schneiden wurde wiederum auf Verunreinigungen geachtet und die Anwesenheit des Neurons im Gefäß stets optisch kontrolliert. Insgesamt wurden mit diesem Verfahren 1530 Neurone dissektiert. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 14 und 15) zeigen exemplarisch in verschiedenen Vergrößerungen die dissezierten Zellen im Sammelgefäß:

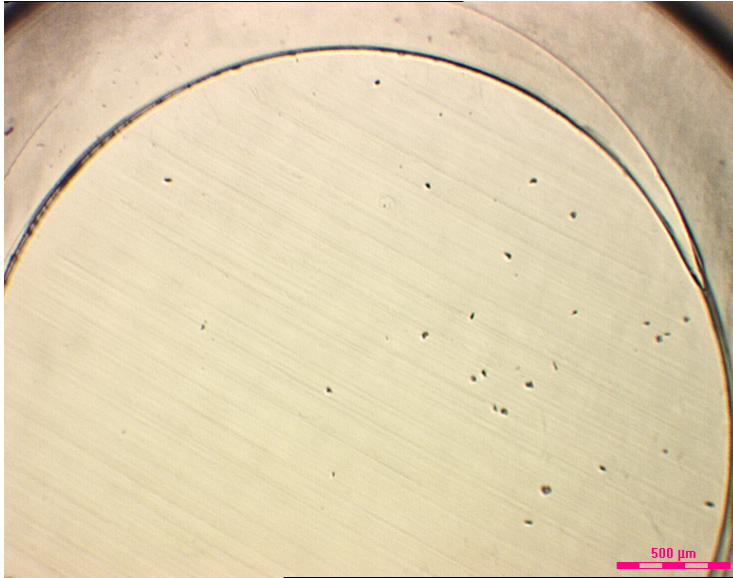


Abbildung 14: Einzelneuronen aus dem FC im Sammelgefäß.

In 6-facher Vergrößerung erkennt man hier die dissezierten Neurone im Deckel des Auffanggefäßes.

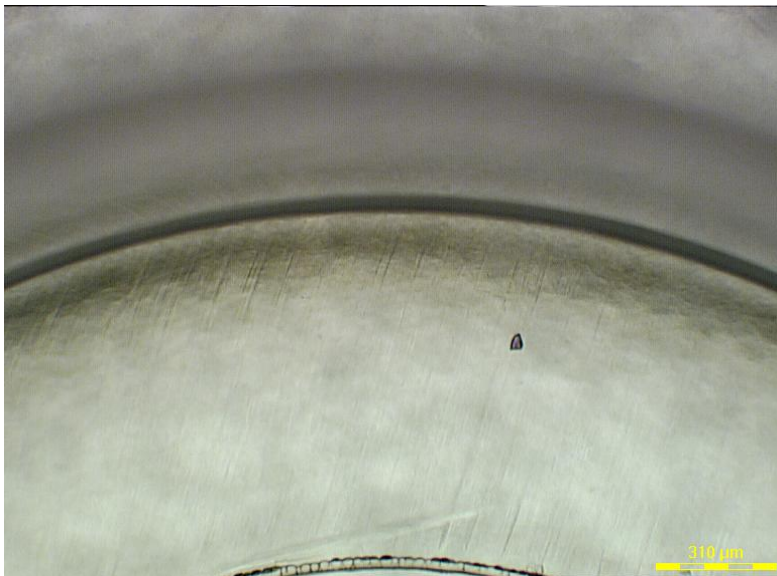


Abbildung 15: Einzelzelle aus dem FC im Sammelgefäß in 40-facher Vergrößerung.

In der Vergrößerung lassen sich nun einzelne Neuronen im Kollektor abgrenzen. So ist es möglich, direkt nach der Dissektion die Zelle im Kollektor zu überprüfen.

3.4.4.4 Transport und Aufbewahrung der dissezierten Zellen

Die Tuben wurden sofort nach der Dissektion vorsichtig und ausschließlich mit Handschuhen entnommen und geschlossen. Die Aufbewahrung bis zum Einfrieren erfolgte in einer Box mit Kühlaggregat, um die Qualität der DNA nicht zu beeinträchtigen. Bis zur anschließenden Extraktion der DNA wurden die Einzelzellen bei -80°C gelagert.

3.4.5 Extraktion der DNA

3.4.5.1 Protokoll der Extraktion der DNA lasermikrodissezierter Zellen

Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem „QIAamp DNA Micro Kit“ des Herstellers Qiagen (Kat.nr. 56304), dessen Vorgaben für lasermikrodisseziertes Material im mitgelieferten Protokoll streng beachtet wurden. Von den verwendeten Materialien waren die Puffer ATL, AL, AW1 und AW2, die Proteinase K, RNA und die membranhaltigen Säulen nebst Sammelgefäß im Kit enthalten (für nähere Informationen sei auf das entsprechende Handbuch verwiesen). Darüber hinaus kamen steril autoklaviertes dH_2O und Ethanol 100% zur Anwendung. Jede Zugabe von Flüssigkeit erfolgte mit steril autoklavierten Pipettenspitzen.

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf jeweils ein Tube dissezierter Zellen.

Die Tuben mit den darin enthaltenen Einzelzellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und bei 10 000 rpm für 45 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden 15 μl des Puffers ATL und 10 μl Proteinase K zugegeben und diese Mischung 15 Sekunden lang pulsatil per Vortexer gemischt.

Nach dreistündiger Inkubation (300 rpm) bei 56°C und Auflösen von eventuellen Ausfällungen wurden wiederum 25 μl des Puffers ATL, sowie eine vorher zubereitete Mischung von 50 μl des Puffer AL und 1 μl RNA zupipettiert und danach 50 μl Ethanol zugegeben. Wie zuvor erfolgte die pulsatile Mischung der Flüssigkeit mit Hilfe des Vortexers

für 15 Sekunden. Es schloss sich eine Inkubation bei Raumtemperatur von 5 Minuten Dauer an.

Nach dieser Inkubation und einer kurzen Zentrifugation (8000 rounds per minute (rpm), 1 min), um eventuelle Flüssigkeitsrückstände am Deckel oder den Seitenwänden der Tube zu entfernen, wurde das Lysat mit einer Pipette vorsichtig in bereitgestellte kleine Säulen transferiert, wobei Sorge getragen wurde, den Rand nicht mit der DNA-haltigen Flüssigkeit zu benetzen. Die Säule wurde in eine 1,5 ml fassende Sammeltube gesetzt und das Lysat bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die Säule in eine leere Sammeltube gestellt, der abzentrifugierte Rest in der alten Sammeltube verworfen. Danach wurden 500 µl des Puffers AW1 in die Säule pipettiert, wiederum ohne den Rand zu benetzen. Die Säule mit Inhalt wurde bei Raumtemperatur zu denselben Bedingungen wie bereits beschrieben (8000 rpm, 1 min) zentrifugiert, in eine neue Sammeltube gegeben und der abzentrifugierte Rest verworfen. 500 µl Puffer AW2 folgten; dieser Zugabe schlossen sich dieselben Schritte - Zentrifugation bei 8000 rpm für eine Minute, Transfer in eine neue Sammeltube, Verwerfen des zentrifugierten Überstandes - an. Die Säule wurde in einer sauberen neuen Sammeltube nun für drei Minuten bei voller Zentrifugengeschwindigkeit (14 000 rpm) zentrifugiert. Der abzentrifugierte Rest wurde verworfen und die Säule in ein 1,5 ml fassendes Eppendorfgefäß gesetzt. Auf das Zentrum der nun getrockneten Säulenmembran wurden 30 µl destilliertes Wasser pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Zuletzt wurde nochmals 1 Minute lang bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, das Eppendorfgefäß mit der so erhaltenen DNA geschlossen und etikettiert.

Die Aufbewahrung der extrahierten DNA erfolgte bei 4°C.

3.4.5.2 Extraktion der Kontroll- DNA

Um eine Kontroll-DNA ohne mitochondriale Deletionen zu erhalten, wurde das Blut einer 35-jährigen männlichen Kontrollperson ohne mitochondriale Erkrankung verwendet.

Das venöse Blut wurde nach Abnahme bei 4°C aufbewahrt. Jeweils 100 µl Blut wurden von der Gesamtmenge abpipettiert und unter Verwendung des oben beschriebenen Mikro Kits von Quiagen extrahiert:

Zu 100 µl Blut wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 15 µl Puffer ATL und 10 µl Proteinase K zugegeben und für 15 Sekunden pulsatil gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten (300 rpm bei 56°C), Zugabe von 25 µl Puffer ATL und 50 µl 100% Ethanol folgte wiederum die pulsatile Mischung mit Hilfe des Vortexers für 15 Sekunden. Das restliche Procedere folgte der unter 3.4.5.1. (Protokoll der Extraktion der DNA lasermikrodissezierter Zellen) beschriebenen Anleitung. Die Kontroll- DNA wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 4°C aufbewahrt.

3.4.6 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion

3.4.6.1 Protokoll der rt-PCR

Das Protokoll der hier verwendeten rt-PCR stützt sich im Wesentlichen auf die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe He und Kollegen[172]. Es wurde entwickelt, um eine suffiziente Analyse der mtDNA einer einzigen Zelle zu ermöglichen und so die Höhe der Deletionslast einer Zelle zuverlässig zu quantifizieren. Auf diesem Protokoll basieren bereits einige Arbeiten, die signifikante Ergebnisse zeigen konnten[108, 181] und die Zuverlässigkeit dieses Protokolls bestätigen.

3.4.6.2 Auswahl der Gene

Aufgrund der bereits unter Punkt 1.2.3.2. (Mutationen des mitochondrialen Genoms) erläuterten Lokalisation des Hauptanteils der Deletionen wurden in dieser Arbeit zwei mitochondriale Gene zur Quantifizierung ausgewählt: die beiden mitochondrialen Gene *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1* (MT-ND1) und *mitochondrially encoded*

NADH dehydrogenase 4 (MT-ND4) (siehe Abbildung 16). ND1 ist deletionsstabil, während ND4 in einer Region des mt-Genoms liegt, die sehr oft von Deletionen betroffen ist, dem „*major arc*“.

MT-ND4 codiert, wie der Name bereits vermuten lässt, für die NADH Dehydrogenase 4. Dieses Enzym ist Teil des Komplex 1 der Atmungskette. MT-ND4 ist im so genannten *major arc* des mitochondrialen Genoms lokalisiert (Basenpaare 10760-12137), und demzufolge sehr oft deletiert (in 82% aller Fälle mit einer Einzeldelation und 96% der Fälle mit multiplen mtDNA- Deletionen). Eine Abnahme der DNA-Menge des Gens MT- ND4 bietet sich also als suffizientes Maß für die totale Deletionslast einer Zelle an[172, 182].

MT-ND1 hingegen codiert für die NADH Dehydrogenase 1, ein Protein, das einen großen Teil des Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette bildet. Dieses Gen liegt außerhalb des von Deletionen häufig betroffenen *major arc* (Basenpaare 3307- 4236); tatsächlich zeigt die Datenlage, dass es in 94% der Fälle mit einer Einzeldelation im mtGenom noch vorhanden war, bei Fällen mit multiplen Deletionen sogar in 100%[182]. Demzufolge eignet sich MT-ND1 gut als interne Kontrolle und Referenzgen. Das Mengenverhältnis der Gene MT-DN1 zu MT-ND4 sollte es dementsprechend ermöglichen, Aussagen über den Deletionsgehalt einer Einzelzelle zu machen.

He et al konnten die Sensitivität dieser Methode bezüglich auch geringer mtDNA- Mengen, wie sie in Einzelzellen vorkommen, nachweisen; die beiden Reaktionen von ND1 und ND4 liefen gleich effizient ab - eine Voraussetzung für die Anwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Ein Vergleich des so gemessenen Deletionslevels mit diesbezüglich bereits etablierten Methoden wie Southern Blot und three-primer-competitive PCR, bestätigte diese Methode nicht nur als vergleichbares und reproduzierbares Mittel zur Quantifizierung der mtDeletionslast einer Einzelzelle, sondern zeigte im Gegenteil darüber hinaus den Vorteil, den Deletionsgehalt gleichermaßen von Einzelzellen und auch von größeren DNA-Proben messen zu können[172].

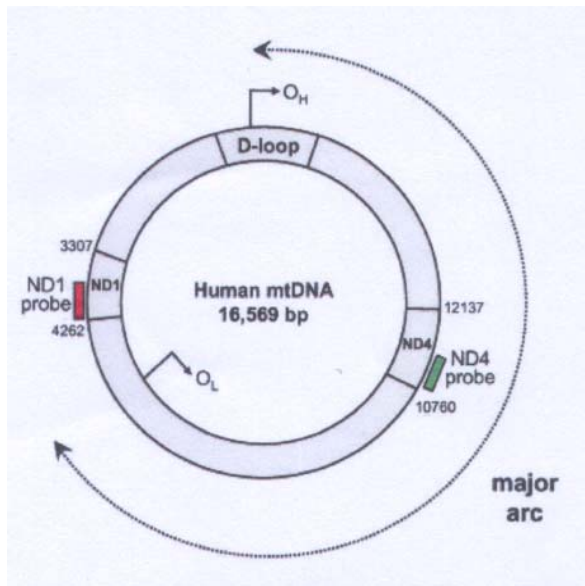


Abbildung 16 [118, 172]: Das mitochondriale Genom.

Farbig hervorgehoben sind auf der linken Seite die Bindungsstellen der Fluoreszenz-markierten Probes in den Genen ND1 (rot) und ND4 (grün), die für die real-time PCR amplifiziert wurden. Die Mehrheit der Deletionen des mtGenoms betrifft den „major arc“ zwischen dem Ursprung der „heavy-strand“ Replikation (OH, Nukleotide 110-441 und dem Ursprung der „light strand“ Replikation; OL, Nukleotide 5721-5798). ND4 ist somit sehr häufig von Deletionen betroffen, während ND1 erhalten bleibt.

3.4.6.3 Auswahl der Primer und fluoreszierenden Sonden

Die Primer wurden gemäß der Datenbank des humanen Mitochondriengenoms [182] entsprechend der erwünschten Zielgene ND1 und ND4 ausgewählt.

Die Sequenzen lauten wie folgt:

L_ND1: 5'- CCC-TAA-AAC-CCG-CCA-CAT-CT-3'

H_ND1: 5'-GAG-CGA-TGG-TGA-GAG-CTA-AGG-T-3'

L_ND4: 5'-CCA-TTC-TCC-TCC-TAT-CCC-TCA-AC-3'

H_ND4: 5'-CAC-AAT-CTG-ATG-TTT-TGG-TTA-AAC-TAT-ATT-T-3'

Die in fester Form erhaltenen Oligonukleotide wurden mit sterilem dH₂O auf eine Konzentration von 200 pmol/l gebracht, gevortext, zentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Vor Zugabe wurde das Wasser 30 Minuten im UV- Kabinett bestrahlt, um eine Verunreinigung auszuschließen.

Als fluoreszierende Sonden für die quantitative rt-PCR wurden Taqman®TAMRA Probes der humanen Gene ND1 und ND4 mit der Sequenz:

ND1: 5'-6-FAM- CCA-TCA-CCC-TCT-ACA-TCA-CCG-CCC-TAMRA-3'

ND4: 5'-6-FAM-CCG-ACA-TCA-TTA-CCG-GGT-TTT-CCT-CTT-G-TAMRA-3'

als lyophilisierte Pellets bezogen. Wie aus den beschriebenen Sequenzen zu ersehen, diente als Reporter der Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM, Anregung bei 492 nm, Emission bei 515 nm), als Quencher 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin (TAMRA, Anregung bei 555 nm, Emission bei 580 nm).

Durch Zugabe eines 1 mM Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCL)-Puffers (pH 8,0) wurden die Pellets in flüssige Form gebracht und auf 5 pmol/l konzentriert, daraufhin nach ND1 und ND4 getrennt in sterile, DNase freie 0,2 ml Tuben zu je 100 µl aliquotiert. Die Aufbewahrung dieser so befüllten Tuben erfolgte bei -20°C. Einmal aufgetaute und für die quantitative real-time- Polymerasekettenreaktion benutzte Taqman®TAMRA Probes wurden nicht wieder eingefroren, sondern bis zu ihrem Aufbrauchen im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.4.6.4 Mastermix und Ziel-DNA

Der für die rt-PCR benötigte Mastermix wurde mit dem Taqman Reagent Core® hergestellt, das alle Trinukleotide (ATP, CTP, GTP, UTP), Puffer, Uracyl-N-Glucosylase und die

Taqman® Polymerase Gold enthält. Bovine Serum Albumin (BSA) wurde von Ambion bezogen, das dH₂O vor der Verwendung autoklaviert und kurz vor Zugabe im UV-Kabinett bestrahlt.

Die Herstellung erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 13: Tabellarisches Protokoll der Mastermix-Zubereitung

Reagenz	ND1	ND4
dH ₂ O	7,6 µl	6,6 µl
Puffer	2 µl	2 µl
Mg	2,4 µl	3,2 µl
ATP	0,4 µl	0,4 µl
CTP	0,4 µl	0,4 µl
GTP	0,4 µl	0,4 µl
UTP	0,2 µl	0,4 µl
UNG	0,2 µl	0,2 µl
BSA (1:50)	1 µl	1 µl
L (Primer)	0,1 µl	0,1 µl
H (Primer)	0,6 µl	0,6 µl
Probe	0,6 µl	0,6 µl
Taqman® Polymerase Gold	0,1 µl	0,1 µl

Die angegebene Menge ist für die Untersuchung jeweils einer Kapillare (Mastermix und DNA) zu verstehen. Sie wurde entsprechend der gewünschten Anzahl der zu untersuchenden DNA-Muster multipliziert.

Die bei -20°C gelagerten Ingredienzien für den Mastermix wurden im Inkubator bei 37°C unter beständigem Rotieren (300 rpm) aufgetaut, danach während der gesamten Prozedur auf Eis kühl gehalten. Die Taq-Polymerase wurde erst kurz vor ihrer Verwendung aus dem Gefrierfach entnommen und nach Zugabe sofort wieder dorthin verbracht, um einer vorzeitigen Denaturierung und dem daraus resultierenden Funktionsverlust des Enzyms vorzubeugen.

Um höchste Sterilität zu gewährleisten wurden Einwegpipettenspitzen, Pipetten, autoklaviertes dH_2O , sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße, sowie die Kapillaren vor Benutzung im UV-Kabinett 30 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt.

Die Herstellung des Mastermix' sowie die Zugabe der DNA und des sterilen Wassers erfolgte ausschließlich unter Verwendung von sterilen Handschuhen und Mundschutz im UV-Kabinett.

Zunächst wurden die aufgetauten und kühl gelagerten Ingredienzien vor Verwendung sorgfältig gevortext und geschüttelt, hierauf kurz zentrifugiert. Jeder einzelne Bestandteil wurde gemäß der oben angegebenen Reihenfolge mit sterilen Einwegpipettenspitzen nacheinander in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Das reine BSA kam in einer 1:50 Verdünnung mit sterilem dH_2O zur Anwendung, alle anderen Stoffe wurden unverdünnt zugemischt. Die frischen Mastermix- Mischungen wurden gevortext und bei 2000 rpm für eine Minute zentrifugiert, danach ebenfalls auf Eis kühl gelagert.

Die Befüllung der Kapillaren erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen im bei 4°C vorgekühlten Thermoblock. Vor Zugabe der DNA wurden jeweils 16 μl des entsprechenden Mastermix' für ND1 und ND4 vorgelegt. Es schloss sich die Zugabe der zu untersuchenden DNA an, die vor Verwendung ebenfalls auf Eis gekühlt, gevortext und kurz zentrifugiert wurde.

Jeder Kapillare wurden zu den 16 μl vorgelegten Mastermix 4 μl DNA zugegeben.

Zur Kontrolle des Experiments wurde immer für ND1 und ND4 jeweils eine Kapillare mit der DNA aus dem Blut einer 35 jährigen Kontrollperson und eine zweite mit sterilem dH₂O befüllt. Um Kontamination zu vermeiden wurde für die Befüllung jeder Kapillare eine neue sterile Pipettenspitze verwendet und danach die Kapillare sofort verschlossen.

Nach erfolgter Zugabe von Mastermix und DNA-Proben, wurden die Kapillaren für 1 Minute bei 2000 rpm zentrifugiert, und im gekühlten Thermoblock zum Light-Cycler transportiert. Jede DNA-Probe wurde dreimal im Light-Cycler vervielfältigt.

3.4.6.5 Technische Vorgaben der DNA-Vervielfältigung im Light-Cycler

Die PCR im Light-Cycler wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt die sich bereits bei vorangegangenen Experimenten bezüglich ähnlicher Fragestellung bewährt hatten[108, 172]. Der PCR-Durchgang bestand aus drei Phasen: der inkubativen Phase, der Quantifizierung und der anschließenden Kühlung.

Der Inkubation von 10 Minuten bei 95°C (1 Zyklus) schloss sich die Quantifizierungsphase in 45 Zyklen an. Die Amplifikation der DNA erfolgte hier in drei Stufen: für 10 s bei 95°C, dann weitere 30s bei 58°C und schließlich 2 s bei 72°C.

Die Kühlung (1 Zyklus) erfolgte bei 40°C für 30 s.

In jedem Durchlauf wurde jeweils für ND1 und ND4 die DNA einer 35-jährigen männlichen Kontrolle ohne mitochondriale Erkrankung, sowie eine Probe mit sterilem H₂O mit amplifiziert.

Alle H₂O – Kontrollen mit einem CT- Wert über 35 wurden als steril betrachtet.

Bei Verunreinigungen der mit sterilem dH₂O bestückten Kontrolle (ab einem CT-Wert < 34) wurde das Ergebnis verworfen und das Experiment wiederholt. Ebenso wurde verfahren, wenn die CT-Werte von ND1 und ND4 der mit junger Kontroll- DNA befüllten Kapillare um mehr als 0,2 Zählheiten voneinander abwichen.

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Kapillaren fachgerecht entsorgt und das Ergebnis gesichert.

3.5 Statistische Auswertung der Deletionsquantifizierung mit Real-time PCR

3.5.1 Hypothesen

Mit der vorliegenden Arbeit sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

Deletionslast der mitochondrialen DNA in den unterschiedlichen Gehirnregionen:

Nullhypothese:

H₀: Die Deletionslast der mtDNA bei Alzheimer-Patienten ist im FC nicht höher, als in den anderen untersuchten Gehirnregionen dieser Patientengruppe (SN und Put).

Alternativhypothese:

H₁: Die Deletionslast der mtDNA bei Alzheimer-Patienten ist im FC signifikant höher, als in den anderen untersuchten Gehirnregionen dieser Patientengruppe (SN und Put)

Deletionslast der mitochondrialen DNA von Alzheimer-Patienten und Kontrollgruppe:

Nullhypothese:

H₀: Die Deletionslast des FC ist bei Alzheimer-Patienten nicht höher, als die Deletionslast des FC der Kontrollgruppe.

Alternativhypothese:

H₁: Die Deletionslast des FC ist bei Alzheimer-Patienten signifikant höher, als die Deletionslast des FC der Kontrollgruppe.

Die CT-Werte der einzelnen Amplifikationsproben wurden von der Software des Light-Cyclers nach Ende des PCR-Durchgangs ausgegeben. Anschließend wurden diese CT-Werte unter Zuhilfenahme der unter Punkt 1.3.1. (Technische Grundlagen und Auswertungsmethode der rt-PCR) ausführlich erklärten $\Delta\Delta$ -CT- Formel zueinander in Beziehung gesetzt und somit der Deletionsanteil errechnet. Verwendete Software war Microsoft Office Excel 2003.

Alle folgenden statistischen Auswertungen für Hypothesentestung und Gruppenvergleiche wurden mit SPSS 12.0 für Windows durchgeführt. Für den Vergleich zweier Gruppen (wie zum Beispiel für den Vergleich zweier Patientengruppen) wurde ein zweiseitiger T-Test herangezogen. Wurden drei Gruppen verglichen (zum Beispiel drei verschiedene Gehirnareale einer Patientengruppe) wurde eine Varianzanalyse in Form eines ANOVA Tests benutzt. Als Signifikanzniveau für sämtliche statistischen Analysen wurde ein Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Qualitative Beschreibung der erhaltenen Einzelergebnisse

4.1.1 Ergebnisse der Real-time PCR

Insgesamt wurden für diese Studie 1530 Neurone untersucht. Jedes Neuron wurde nach Anfärbung unter dem Mikroskop einzeln markiert und mit dem Laser disseziert. Für jeden Patienten wurden 30 Neurone pro Gehirnregion in einem Tube zusammengefasst, was einer Gesamtzahl von 90 Zellen pro Patient entspricht.

Die zur letztlichen Ermittlung der Neuronen-Deletionslast verwendeten Daten ergaben sich aus den CT-Werten der entsprechenden DNA-Proben. Insgesamt wurden drei Amplifikationszyklen pro untersuchter Region durchgeführt und deren Mittelwerte verglichen.

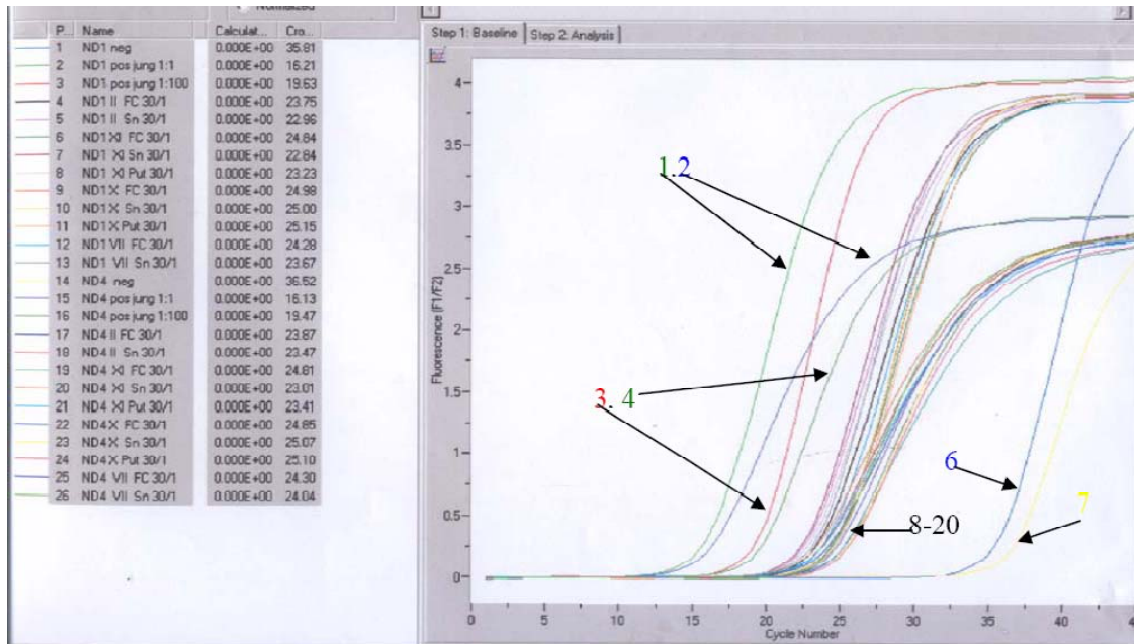


Abbildung 17: Screenshot der real-time PCR-Amplifikation.

Anzahl der Amplifikationszyklen und Fluoreszenzanstieg sind auf der rechten Bildseite grafisch gegeneinander aufgetragen. Links im Bild das numerische Äquivalent mit farblicher Kodierung des Fluoreszenzanstiegs der entsprechenden DNA-Proben und deren exakter CT-Werte. Je niedriger dieser CT-Wert, desto eher ist der Fluoreszenzanstieg zu messen und umso größer ist die enthaltene DNA-Menge der amplifizierten Probe. Numerisch bezeichnet sind einzelne Graphen bezeichnet. Eine detailliertere Erläuterung findet sich im Text unter 1.3. (Real-time Polymerasekettenreaktion – Einführung und theoretische Grundlagen).

Abbildung 17 zeigt exemplarisch die erhaltenen Ergebnisse der Amplifikation der mt-DNA aus den dissezierten Neurone. Die farbigen Graphen zeigen den Fluoreszenzanstieg im Laufe der Reaktion an und sind somit ein Bild für die erfolgreiche Amplifikation der zugefügten DNA. Jeder Probe ist eine andere Farbe zugeordnet. Graph 1 und Graph 2 stehen für das Amplifikationsprodukt des Gens ND1. bzw. ND4 der Kontroll-mtDNA mit dH₂O in einer Konzentration von 1:1. Wie hier gut zu sehen, beträgt der CT-Wert des Gens ND1 dieser Probe 16,21, der CT-Wert von ND 4 liegt bei 16,13. Beide Proben haben somit die niedrigsten CT-Werte dieses Amplifikationsdurchgangs, das bedeutet, die Fluoreszenz steigt sichtbar eher an, als die der anderen Amplifikationsprodukte: es sind weniger Zyklen nötig, um ein Amplifikationsprodukt zu erhalten. Beide CT- Werte stimmen fast überein und zeigen somit, dass die DNA-Menge beider Proben gleich ist. Die identischen CT-Werte lassen im Umkehrschluss auch auf eine intakte mtDNA schließen. Ebenso dienen sie als Kontrolle für eine gleich effizient abgelaufene Reaktion. Ähnlich verhält es sich mit Graph 3 und 4, hier

wurden die Gene ND1 und ND 4 der Kontrolle nochmals in einer Verdünnung von 1: 100 amplifiziert. Die CT-Werte liegen mit 19,63 (ND1) und 19,47 (ND4) etwas höher als die der Konzentration 1:1. Dieser Umstand ist durch die niedrigere DNA-Menge bedingt, die durch die Verdünnung erhalten wurde. Beide CT-Werte sind aber ebenso fast identisch und zeigen so ebenfalls eine intakte mtDNA an. Gleichzeitig wird die methodische Zuverlässigkeit dieser DNA-Amplifikationszyklen überprüft und systematische Fehler z.B. bei der DNA-Bestückung ausgeschlossen.

Demgegenüber stehen die Graphen 6 und 7, die jeweils die Amplifikation der mit steril autoklaviertem Wasser bestückten Kontrollprobe bezeichnen. Hier liegen die CT-Werte mit 35,81 und 36,52 deutlich höher als bei allen anderen untersuchten Proben, bzw. es entstand kein Amplifikationsprodukt. Betrug der Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung der H₂O-Probe oberhalb des Schwellenwertes mehr als 35 Zyklen (wie aus den Graphen 6 und 7 ersichtlich), konnten Verunreinigungen der Proben ausgeschlossen werden.

Die CT-Werte der übrigen Proben (Graphen 8-20), liegen im Mittelbereich zwischen den CT-Werten von Kontrolle (Graph 1, 2) und Wasserleerprobe (Graph 6, 7). Sie bezeichnen die Amplifikationsprodukte der untersuchten Neurone von Put, SN und FC. Die mitochondrialen Deletionen jeder untersuchten Region wurden so in mindestens drei Amplifikationsdurchgängen quantitativ ausgewertet.

4.1.2 Quantitative Berechnung der Deletionen

Die erhaltenen CT-Werte der einzelnen Regionen wurden nun unter Zuhilfenahme der $\Delta\Delta$ -CT- Formel zueinander in Beziehung gesetzt und somit der Deletionsanteil errechnet.

Für diese Berechnung wurde die unter 1.3.1 (Technische Grundlagen und Auswertungsmethode der rt-PCR) ausführlich beschriebene Formel herangezogen.

Diese Werte dienten als Ausgangsbasis für die anschließenden statistischen Tests, mit denen untersucht wurde, ob sich die Deletionslevel in den verschiedenen Gehirnregionen in ihrer Verteilung oder innerhalb der verschiedenen Gruppen signifikant unterschieden.

4.1.3 Statistische Auswertung der Deletionslevel der untersuchten Regionen im Vergleich

Für den Vergleich zweier Gruppen (wie zum Beispiel für den Vergleich zweier Patientengruppen) wurde ein zweiseitiger T-Test herangezogen. Wurden drei Gruppen verglichen (zum Beispiel drei verschiedene Gehirnareale einer Patientengruppe) wurde eine Varianzanalyse in Form eines ANOVA Tests herangezogen.

Die statistischen Ergebnisse stellten sich wie folgt dar:

Betrachtet man die Alzheimer Patienten, so wiesen sie in der ANOVA 32% +/- 11% mtDeletionen in der SN auf. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) gegenüber der vergleichsweise niedrigen Deletionslast des FC (13% +/- 10%) und des Put (14% +/- 9%).

Bei den Kontrollpersonen waren in der ANOVA ebenfalls signifikant höhere Deletionswerte in der SN (35% +/- 10%) und geringere Deletionswerte im FC (14% +/- 10%) und im Put (14% +/- 10%) zu finden ($p < 0,01$).

Der Vergleich der einzelnen Gehirnregionen (zweiseitiger T-Test) von Alzheimer- und Kontrollgruppe zueinander zeigte weder für die SN ($p > 0,6$), noch für den FC ($p > 0,9$) oder Put ($p > 0,8$) signifikante Unterschiede in der mtDNA-Deletionslast.

Betrachtet man die Gesamtergebnisse, so ergab die Untersuchung der mtDNA aller 1530 dissezierten Neurone keinen statistisch signifikanten Unterschied der mtDNA-Deletionslast zwischen beiden analysierten Gruppen. Allerdings zeigte sich ein signifikant höherer Anteil von Deletionen in der mitochondrialen DNA der SN, der sich sowohl bei Alzheimer-Patienten, als auch bei den Kontrollpersonen nachweisen ließ. In der folgenden Abbildung 19 sind die erhaltenen Ergebnisse noch einmal grafisch aufgetragen:

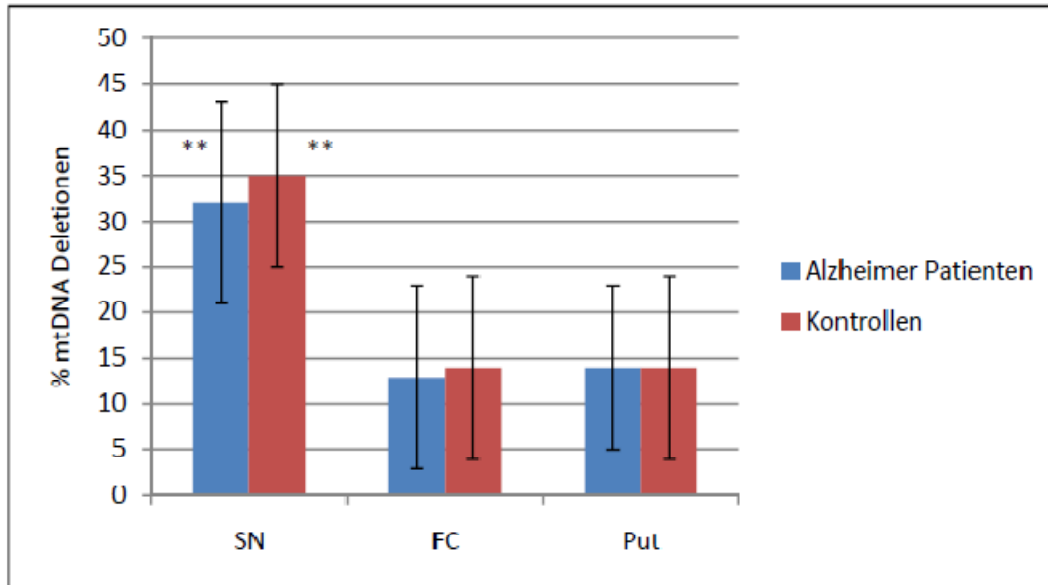


Abbildung 18: Ergebnisse der Deletionsquantifizierung.

MT-DNA Deletionen von Alzheimer-Patientengruppe (schwarze Säulen) und Kontrollgruppe (graue Säulen). Die Säulen repräsentieren eine Deletionslast von jeweils 30 Neuronen in den verschiedenen Gehirnregionen (SN = Substantia nigra, FC = Frontaler Kortex, Put = Putamen).

*** : Signifikanzniveau <0,01 im ANOVA-Vergleich aller drei untersuchten Gehirnregionen.*

Die Deletionslast der mitochondrialen DNA der Substantia nigra ist bei beiden Vergleichsgruppen signifikant höher, als die Deletionslast beider Gruppen in Putamen und frontalem Kortex.

Somit mussten beide Alternativhypothesen (H_0 : Die Deletionslast des frontalen Kortex ist bei Alzheimer- Patienten nicht höher, als die Deletionslast des frontalen Kortex der Kontrollgruppe; H_1 : Die Deletionslast der mitochondrialen DNA bei Alzheimer-Patienten ist im frontalen Kortex signifikant höher, als in den anderen untersuchten Gehirnregionen dieser Patientengruppe (Substantia nigra und Putamen) verworfen werden. Es zeigte sich jedoch bei beiden untersuchten Gruppen ein höherer Deletionsanteil der SN.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie man aus den unter 4.1.3. (Statistische Auswertung der Deletionslevel der untersuchten Regionen im Vergleich) beschriebenen Ergebnissen ersehen kann, konnten wir mit dieser Arbeit nachweisen, dass dopaminerge Neurone der Substantia nigra - unabhängig von der Grunderkrankung - vermehrt von Deletionen der mtDNA betroffen sind.

Somit bestätigten sich einerseits die Ergebnisse früherer Studien[108] - auch in dieser Arbeit konnten wir einen größeren Anteil deletierter mtDNA in den Neuronen der SN feststellen. Diese Ergebnisse bestätigen auch den methodischen Vorteil der von uns benutzten Kombination aus LMD und rt-PCR, mit der die direkte Untersuchung einzelner Neurone möglich ist. Hierbei erhielten wir signifikant höhere Werte an mtDNA-Deletionen, als bei den Untersuchungen von Gewebshomogenaten vergangener Jahre[143, 157]. Die Zuverlässigkeit der hier verwendeten Methodik lässt sich durch die gute Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit denen der erwähnten Arbeiten zeigen. Allerdings entsprach die Verteilung des mtDNA-Deletionsanteils in den jeweiligen Gehirnregionen insgesamt nicht unseren Erwartungen. In früheren Arbeiten war es gelungen, bei neurodegenerativen Krankheiten wie dem Parkinson-Syndrom in den pathologisch hauptsächlich betroffenen Gehirnarealen auch einen höheren Deletionsanteil der mtDNA nachzuweisen[108]. Da wir dasselbe Phänomen auch für Morbus Alzheimer zeigen wollten, hatten wir bei Alzheimer-Patienten Neuronen des frontalen Kortex untersucht, da diese Region in diesem Fall bei längerem Krankheitsverlauf stark pathologisch betroffen ist. Wir waren von der Vermutung ausgegangen, dass sich auch hier eine vermehrte Deletionslast zeigen ließe. Dies ließ sich jedoch in dieser Studie entgegen unserer Hypothese nicht verifizieren. Vielmehr zeigte sich überraschenderweise, dass die Deletionslast der mtDNA bei gesunden Kontrollpersonen und Alzheimer-Patienten in der SN am höchsten war. Dieses Ergebnis entsprach insofern nicht unseren Erwartungen, als die Degeneration dieser Zellen vor allem bei der Parkinson-Krankheit gezeigt werden konnte[183] und für Alzheimer-Patienten oder Gesunde bislang nicht berichtet wurde. Trotzdem lässt sich aus den vorliegenden Daten schließen, dass offenbar dopaminhaltige Neurone der Substantia nigra

besonders anfällig für Deletionen der mtDNA sind. Die Gründe dafür sind bis jetzt noch weitgehend unklar. Um weitere Ansatzpunkte zu finden, die die Ursache dieses Phänomens erklären könnten, ist eine nähere Betrachtung und Diskussion unserer Ergebnisse aus verschiedenen Blickwinkeln notwendig.

5.2 Methodische Einschränkungen

5.2.1 Auswahl der Gehirnregionen

Die histologisch beschriebenen pathologischen Veränderungen bei Alzheimer betreffen vor allem Hippocampus, FC und Locus coeruleus und bestehen aus intrazellulären Ablagerungen des TAU-Proteins[9]. Im zeitlichen Verlauf betreffen diese Veränderungen erst den entorhinalen Kortex, um sich dann weiter auszubreiten und in mehreren Gehirnregionen zu akkumulieren. Im späteren Verlauf der Erkrankung (Braak- Stadium V und VI), sind dann auch histopathologische Veränderungen im FC nachzuweisen[17]. Der FC wurde für diese Arbeit aufgrund der besseren Verfügbarkeit ausgewählt. Sinnvoll erschien diese Auswahl auch, weil im fortgeschrittenem Krankheitsverlauf der FC stark geschädigt ist[184]. Um sicherzustellen, dass im FC der Patienten krankheitsbezogene Schäden zu finden waren, wurde für diese Arbeit nur Gewebe von schwer betroffenen Patienten verwendet, die histopathologisch die Kriterien für ein Stadium nach Braak V oder VI erfüllten. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse unserer Arbeit, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie möglicherweise anders ausgefallen wären, hätte man den Hippokampus oder den entorhinalen Kortex untersucht. Da beide Regionen früher bzw. schon in den Anfängen der Erkrankung von pathologischen Veränderungen betroffen sind, ist bei Untersuchung dieser Regionen das Risiko geringer, pathologisch unveränderte Gebiete zu untersuchen - unter anderem auch deshalb, weil der FC bereits makroskopisch um einiges größer ist, als Hippokampus oder entorhinaler Kortex. Da in unserer Arbeit nur Neurone eines bestimmten Ausschnitts untersucht wurden, könnte durch Zufallsauswahl ein noch pathologisch unauffälliges Gebiet analysiert worden sein. Auf eine Vorabfärbung, mit der eine pathologische Veränderung vor Analyse hätte untersucht werden können, wurden in diesem Fall verzichtet. Stattdessen wurde

das Vorliegen von Braak V/VI zur Einschlußbedingung gemacht. Resümierend kann festgehalten werden, dass mit der Auswahl des FC als Alzheimer- repräsentierende Gehirnregion, unsere Ergebnisse durchaus beeinflusst worden sein könnten, auch wenn dieser Umstand aus unserer Sicht unwahrscheinlich erscheint.

Ein anderer Grund für die niedrige Deletionslast könnte aber auch im Gegenteil durch die starke Schädigung des FC bedingt sein: durch respiratorische Insuffizienz geschädigte Neurone sterben früher ab. Ein weit fortgeschrittenes Krankheitsstadium bedingt so natürlich auch die Selektion stabiler Zellen, deren vergleichsweise niedrige mtDNA-Deletionswerte in unsere Ergebnisse eingingen.

5.2.2 Analyse- und Quantifizierungsmethodik

Unsere Wahl der Methoden zur quantitativen Analyse der Deletionslast folgte der einschlägigen Literatur bezüglich ähnlicher Fragestellungen. Vor allem zu nennen sind hier die Arbeiten von He et al. [172] und Bender et al.[108], auf deren Protokolle sich unser Vorgehen hauptsächlich stützte und deren Ergebnisse wir im Großen und Ganzen bestätigen konnten. In einem Punkt allerdings unterscheidet sich unser Projekt von den vorausgehenden Arbeiten[108, 117]: in der Anfärbung der zur Dissektion bestimmten Neurone. Aus der bestehenden Literatur ist bekannt, dass Zellen, die mit einem großen Anteil von mtDNA-Deletionen behaftet sind, eine Dysfunktion der COX aufweisen und sich dementsprechend mittels einer auf diesem Enzym basierenden Färbung nicht anfärben lassen[106]. Mittels einer Kombinationsfärbung auf COX (braun) und zusätzlich auf das Enzym Succinatdehydrogenase (SDH, erscheint in der Färbung blau), dessen Funktion auch bei zellrespiratorischer Insuffizienz nicht beeinträchtigt ist, ist es mikroskopisch gut möglich, Zellen mit einer Abnahme der COX-Aktivität zu erkennen. Diese Zellen stellen sich tiefblau angefärbt dar (aufgrund des COX-Defizites tritt nur die blaue SDH-Färbung auf), während die nicht betroffenen Zellen braun (Anfärbung beider Enzyme) erscheinen. Diese Doppelfärbung wird im Allgemeinen bevorzugt, da sie durch die deutlich blaue Färbung eine gute Erkennbarkeit der COX-defizienten Zellen bietet. Prinzipiell zeigt eine solche Färbung indirekte Hinweise auf eine große mtDNA-Deletionslast einer Zelle und bietet sich so zu dem

Zweck an, diese Zellen spezifisch sichtbar zu machen und gezielt zu untersuchen. Da diese Methode enzymbasiert ist, muss die Qualität der zu untersuchenden Gewebe sehr hoch sein, da sonst eine unspezifische Färbung des Gesamtgewebes entsteht und die Abgrenzung einzelner COX-negativer Zellen nicht möglich ist. Für die aktuelle Studie gelang es uns trotz eines seit Jahren zuverlässig etablierten Färbeprotokoll der COX/SDH-Färbung, das in unserem Labor routiniert eingesetzt wird, nicht, eine zufriedenstellende Anfärbung der Gewebeschnitte zu erhalten. Da dasselbe Protokoll bei anderen Geweben einwandfreie Färbung zeigte, ist in diesem Fall die Qualität der Gehirngewebeproben für die aufgetretenen Schwierigkeiten verantwortlich zu machen. Ursächlich hierfür dürfte die im Vergleich zu den Proben anderer Arbeiten leider unumgängliche lange post- mortem- Zeit von bis zu 48 Stunden sein, die durch autolytische Veränderungen die Gewebe für diese Färbung untauglich machte. Aus diesem Grund sahen wir von der COX/SDH- Färbung ab und griffen stattdessen auf eine altbewährte Methode zurück, die unempfindlicher gegen autolytische Veränderungen ist. Mit der unter 3.4.3.3. (Färbeprotokoll der Neuronenfärbung nach Nissl) beschriebenen Färbung nach Nissl gelang uns zwar eine zufriedenstellende Anfärbung der Neurone, jedoch ohne mikroskopische Hinweise auf eine COX-Dysfunktion und somit indirekt auf eine mtDNA-Deletionslast der untersuchten Zelle. Im Unterschied zu Bender et al[108], der spezifisch COX-negative Neurone untersucht hatte, konnten wir aufgrund der beschriebenen Problematik nicht spezifisch diese Zellen dissektieren und untersuchen. Da jedoch diese ausgewählten Zellen ähnliche Deletionsprofile zeigten, ist davon auszugehen, dass einerseits in unseren Proben genügend betroffene Neurone vorhanden waren und dass andererseits in den untersuchten Geweben eine hohe Anzahl betroffener Neurone auftraten. Dies trifft sicherlich für die SN zu. Derselbe Sachverhalt lässt sich prinzipiell für die anderen untersuchten Gehirnregionen (FC, Put) nicht ausschließen. Allerdings lässt sich im Hinblick auf diese methodische Einschränkung keine aussagekräftige Quantifizierung der von mtDNA-Deletionen betroffenen Neurone der anderen untersuchten Regionen machen. Nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die geringe Anzahl der mtDNA-Deletionen im FC und Put aufgrund dieser methodischen Unspezifität gemessen wurde, oder ob diese Regionen tatsächlich weniger betroffen sind. Immerhin, sind die von uns bezüglich der mtDNA-Deletionslast erhobenen Ergebnisse insofern stabil, als sie bei Alzheimer-Patienten und Kontrollpersonen in ähnlicher Höhe und Relation auftraten. Ist es also der Fall, dass tatsächlich die Neurone der SN vermehrt von mtDNA-Deletionen betroffen sind, so ergeben sich hier natürlich Fragen

nach der Ursache der auffälligen mitochondrialen Vulnerabilität dieser Neurone. Diesbezüglich ist es lohnend, sich mit diesen Neuronen spezifisch zu befassen, um mögliche Ursachen für ihre erhöhte Deletionslast zu finden. Folgend soll dementsprechend auf mögliche Ursachen unserer Ergebnisse eingegangen werden, deren Gründe in den Neuronen selbst zu suchen sind.

5.3 Der Dopaminstoffwechsel - Ursache einer spezifischen Vulnerabilität?

Da der Dopaminstoffwechsel den betroffenen Zellen eigen ist und sie von den anderen Neuronen wesentlich unterscheidet, ist es natürlich naheliegend, sich mit der Frage nach einer spezifischen Anfälligkeit für mitochondriale Schäden in diesem Fall besonders auf den Dopaminstoffwechsel zu konzentrieren. Und in der Tat sind hier einige Ergebnisse auffällig: Bekannt ist zum Einen, dass der Dopaminstoffwechsel an sich bereits eine höhere Produktion von ROS zur Folge hat[185, 186]. Dopamin wird unter anderem zu Wasserstoffperoxid und Superoxid verstoffwechselt[187]. Hierbei entstehen durch die Aktivität der Monoaminoxidase (MAO) überdies Semiquinon und Ubisemiquinon, die wiederum ihrerseits zur Entstehung von ROS beitragen[188-190]. Spezifisch dopaminerge Neurone sind auch besonders vulnerabel gegenüber neurotoxischen Verbindungen, wie zum Beispiel Rotenon, die gezielt die Atmungskette schädigen[191, 192]. Und darüber hinaus ist bekannt, dass auch Dopamin selbst eine schädigende Wirkung auf Mitochondrien haben kann: Es inhibiert selektiv Komplex I der Atmungskette[193, 194] [195, 196]. Die übrigen Strukturen der Atmungskette bleiben davon zwar unbeeinflusst, doch da Komplex I als Hauptbestandteil einer suffizienten Funktion der Atmungskette angesehen werden kann[197], würde diese Schädigung sehr wohl zu einer mitochondrialen Dysfunktion und somit nach der „vicious cycle theory“ sekundär zu einer mtDNA- Schädigung führen.

Weiterhin sind hinsichtlich dopaminerger Strukturen und neurodegenerativen Erkrankungen besonders zwei Stoffe zu nennen, von denen ein ursächlicher Zusammenhang mit neurodegenerativen Pathologien vermutet wird: Eisen und Neuromelanin. Neuromelanin ist ein weiteres Nebenprodukt des Dopaminstoffwechsels und kommt deswegen in dopaminergen

Neuronen in hoher Konzentration vor. Es erhöht offensichtlich die Anfälligkeit der SN-Neurone für degenerative Prozesse[198, 199]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es in vitro sowohl isoliert, als auch in Verbindung mit Eisen als Eisen(III)- Melanin- Komplex zytotoxische Wirkung auf dopaminerge Neuronen hat[200, 201]. Dieser Komplex lagert sich bekannterweise in Locus coeruleus und SN ab, wobei die Konzentration dieser Ablagerungen mit dem Alter ansteigt und in der SN viel stärker zunimmt, als im Locus coeruleus[202]. Neuromelanin induziert außerdem besonders in den Mitochondrien durch die Freisetzung von Eisen ebenfalls oxidativen Stress[203] und könnte somit natürlich für die von uns beobachtete erhöhte mtDNA- Deletionsrate dieser Neuronen verantwortlich sein.

Die vielfältige oxidative Wirkung von Eisen wiederum ist schon lange bekannt: unter anderem triggert es die Bildung von ROS aus Wasserstoffperoxid[65] und interagiert mit mehreren ROS-erzeugenden Stoffwechselwegen[200]. Zusätzlich fördert es vor allem in Verbindung mit ROS die Aggregation von Proteinen wie α -Synuclein, das ebenfalls als Neurotoxin bekannt ist und dessen Akkumulation für die Pathophysiologie mehrerer neurodegenerativer Krankheiten (sogenannte α - Synucleinopathien wie z.B. M. Parkinson, Multisystematrophie oder Lewy-Body-Demenz) verantwortlich gemacht wird. Dieses Protein bildet vor allem in Gegenwart von Dopamin und Wasserstoffperoxid Aggregate mit Ubiquitin. Diese Aggregate stören das cytosolische Stoffwechselgeschehen, unter anderem auch in den intraneuronalen Mitochondrien. Es wird vermutet, dass dadurch Kaskaden des programmierten Zelltodes aktiviert werden und das Neuron aus diesem Grund untergeht[204]. Die erhöhte Deletionslast der von uns untersuchten dopaminergen Zellen ließe sich auch als Ausdruck einer solchen mitochondrialen Schädigung interpretieren.

Weitere Hinweise auf eine pathologische Wirkung von Eisen liefert die simple Beobachtung, dass sich in den von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder auch Parkinson betroffenen Gehirnregionen eine erhöhte Eisenkonzentration nachweisen lässt[204]. Hinsichtlich der von uns beobachteten erhöhten Vulnerabilität von Neuronen der Substantia nigra könnte das bedeuten, dass sowohl bei M. Parkinson, M. Alzheimer und dem normalen Alterungsprozess ähnliche pathophysiologische Mechanismen eine Rolle spielen. Gestützt wird diese These auch durch den Ansatz, α -Synucleinopathien (wie M. Parkinson) und Tauopathien (wie M. Alzheimer) zunehmend nicht mehr als völlig unterschiedliche Entitäten, sondern vielmehr als unterschiedliche Ausprägung eines gemeinsamen pathologischen

Kontinuums zu betrachten[205]. So entwickeln viele Alzheimer-Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Demenz extra-pyramidal-motorische Symptome, ähnlich denen einer Parkinson-Erkrankung[206, 207].

Durch den hohen Gehalt an oxidierbarem Dopamin und ungesättigten Fettsäuren, sowie der hohen Eisen- und Neuromelaninkonzentration sind die Neurone der SN darüber hinaus sehr anfällig für generelle Schäden durch oxidativen Stress. Da sie über einen relativ geringen Antioxidationsschutz verfügen, potenzieren sich die Risiken für oxidativ bedingte Schäden natürlich[198, 208, 209] - was auch eine größere mtDNA-Schädigung im Sinne des von uns gezeigten höheren Deletionsanteils zur Folge haben könnte. Passend dazu wurden in der SN altersabhängiger hoher Anteil von COX-defizienten Zellen entdeckt[210].

5.4 Hohe metabolische Aktivität - ein Risiko durch Sauerstoffverbrauch?

Die besondere Anfälligkeit für oxidativen Stress könnte auch durch einen größeren Sauerstoffverbrauch der dopaminergen Neurone entstehen. Hinweise dafür geben mehrere Arbeiten: ein Profil der Genexpression auf RNA- Ebene von SN-Neuronen der Ratte zeigte zum Beispiel eine höhere Konzentration von Genen, die mit dem Energiestoffwechsel in Verbindung stehen[211]. Weiterhin ist bekannt, dass die SN- Neurone bis 50% mehr als andere dopaminerge Neurone des Mittelhirns feuern [35, 212]. Da die mitochondriale Atmungskette ja der Hauptproduktionsort für oxidative Radikale ist, bedeutet die hohe metabolische Aktivität der Neurone der SN durch die gesteigerte Aktivität der Atmungskette ein erhöhtes Risiko für ihre Nukleinsäuren hinsichtlich oxidativ verursachter Schäden[35, 212].

5.5 Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

In vorliegender Arbeit wurden drei Gehirnregionen von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Alzheimer-Erkrankung auf das Vorhandensein von mtDNA-Deletionen untersucht. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer erhöhten mitochondrialen Deletionslast in der hauptsächlich von Alzheimer-Pathologie betroffenen Gehirnregion (FC) zeigte sich dabei jedoch nicht. Dennoch kann ein solcher aufgrund unserer Ergebnisse nicht sicher ausgeschlossen werden. Auch in der aktuellen Literatur finden sich diesbezüglich Hinweise, z.B. wurde über eine hohe Zahl COX-defizienter Neurone in Pyramidenzellen von Hippokampus und Plexus choroideus von Alzheimer-Patienten berichtet [154]. Für eine Verbindung von Deletionslast und M. Alzheimer spricht auch, dass Amyloid β - ein wesentlicher Bestandteil der histopathologischen Veränderungen bei Alzheimer - prooxidativ wirksam ist, in den Mitochondrien akkumuliert und in hoher Konzentration die mitochondriale Bildung von ROS fördert [151]. Diese Umstände sprechen nach der heutigen Datenlage alle für die Entstehung von mtDNA-Deletionen, wie unter 1.2.2.4. (Oxidativer Stress und das mitochondriale Genom) dargestellt [84, 106, 213].

Dass sich bei der aktuellen Untersuchung keine erhöhte Deletionslast im FC zeigte, mag den unter Punkt 5.2.1. (Auswahl der Gehirnregionen) näher beschriebenen methodischen Einschränkungen geschuldet sein. Die vorliegenden Ergebnisse jedenfalls können die These, dass Deletionen der mtDNA eine wesentliche Rolle bei der Pathologie von M. Alzheimer spielen, nicht stützen. Im Gegenteil widersprechen sie in gewisser Hinsicht einem ursächlichen neuropathologischen Zusammenhang.

Dennoch, gerade auch wegen methodischer Einschränkungen, sollte die Frage nach der Rolle von mtDNA-Deletionen bei M. Alzheimer weiterhin nachgegangen werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei der Qualität des zu untersuchenden Gewebes gelten. Eine bessere Gewebequalität ermöglicht die Verwendung der COX-SDH-Färbung und damit die gezielte Untersuchung respiratorisch insuffiziente Neurone auf DNA-Schäden. Des Weiteren könnten, neben dem FC zum Beispiel auch Hippokampus, Locus coeruleus oder Plexus choroideus untersucht werden, um einen Zusammenhang zwischen Alzheimer-Pathologie und mtDNA-Deletionen weiterhin zu klären. Geht man von der Annahme aus, dass sich die hohe Deletionslast im FC durch frühzeitigen Zelltod nicht zeigen ließ, da die geschädigten

Neuronen durch Zelluntergang bereits abgestorben waren und sich demzufolge nicht darstellen ließen, so müsste in Folgeprojekten das Ausmaß der Neurodegeneration miteinbezogen werden. Sinnvoll wäre es hier, Gewebe von Patienten im Anfangsstadium der Krankheit zu untersuchen, um mehr Neurone zur Verfügung zu haben, deren hoher Deletionslevel zwar evident ist, jedoch noch nicht zum Absterben der Zelle geführt hat.

In dieser Untersuchung gelang es uns jedoch, bei beiden untersuchten Gruppen eine deutlich höhere mtDNA-Deletionslast in den Neuronen der SN im Vergleich zu den anderen untersuchten Regionen zu zeigen. Unter 5.3. (Der Dopaminstoffwechsel – Ursache einer spezifischen Vulnerabilität?) wurden einige Gründe ausgeführt, die eine spezifische Vulnerabilität dopaminergener Neurone für mitochondriale Deletionen plausibel erscheinen lassen. Geht man also von der Annahme aus, dass aufgrund des Dopaminstoffwechsels die Anfälligkeit diesbezüglich aktiver Neurone für mtDNA-Deletionen erhöht ist, würde es sich anbieten, andere dopaminerge Strukturen des Gehirns (zum Beispiel das ventrale tegmentale Areal, oder den vorderen cingulären Kortex) auf mtDNA-Deletionen zu untersuchen. Bestätigt sich die Hypothese einer größeren Vulnerabilität des dopaminergen Systems, so könnte die mitochondriale Deletionslast auch in anderen dopaminergen Gehirnstrukturen erhöht sein. Dies könnte auch ein interessanter Ansatzpunkt für die Pathophysiologie anderer Erkrankungen des Gehirns sein, die ursächlich mit dem Dopaminstoffwechsel in Zusammenhang gebracht werden. Eine nicht degenerative Erkrankung in dieser Hinsicht wäre zum Beispiel die Schizophrenie, für deren pathophysiologisches Geschehen in neuesten Arbeiten unter anderem auch eine gestörte dopaminerge Interaktion mit mitochondrialen Strukturen diskutiert wird[214, 215].

Als abschließendes Resümee ist anzumerken, dass in dieser Arbeit mit vielversprechender Methodik interessante Ergebnisse bezüglich des Dopaminstoffwechsels und mtDNA-Deletionen erzielt werden konnten. In diesem Sinne reiht sich diese Arbeit in die bestehenden zahlreichen Veröffentlichungen ein, die einen wahrscheinlichen Zusammenhang zwischen oxidativen Stress, Neurotoxinen und dopaminerg-neuronaler Vulnerabilität diskutieren.

Letztlich zeigt sich auch, dass die Untersuchung einzelner Neurone auf mtDNA-Deletionen mit Hilfe der LMD und rt-PCR stabile Ergebnisse zeigt und viel Potential in sich birgt.

Gerade weil die Rolle der Mitochondrien im pathophysiologischen Geschehen der Zelle noch nicht völlig verstanden ist, bleiben viele Fragen, die gelöst werden wollen. Die Forschung der letzten Jahre hat es zwar verstanden, ein wenig Licht auf die Beteiligung der Mitochondrien für einige Krankheiten zu werfen. Gerade im Hinblick auf Altern und altersassoziierte Erkrankungen birgt die mitochondriale Genetik unter dem Gesichtspunkt der Schädigung durch oxidativen Stress noch viele Möglichkeiten. Trotzdem bleibt die Frage nach der pathophysiologischen Bedeutung der Mitochondrien im Augenblick noch offen und wird nach wie vor kontrovers diskutiert[216]. Sind die Mitochondrien tatsächlich „the biologic clock“, wie Harman 1972 postulierte[88]? Sind sie tatsächlich verantwortlich für neurodegenerative Alterserkrankungen wie Linnane vermutete[87]? Es bleibt die Herausforderung der kommenden Jahre, dies herauszufinden.

6 Literaturverzeichnis

1. Alzheimer, A., *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin, (Berlin), 1907. **64**: p. 146-148.
2. Gesellschaft, D.A., *Deutsche Alzheimer Gesellschaft*. [http:// www.deutsche-alzheimer.de](http://www.deutsche-alzheimer.de).
3. Bauer, J., Hüll, M., Lieb, K., Berger, M., *Diagnostik und medikamentöse Therapie der Demenz vom Alzheimer-Typ*. Nervenheilkunde, 1995. **14**: p. 146-155.
4. Shulman, K.I., et al., *IPA survey of brief cognitive screening instruments*. Int Psychogeriatr, 2006. **18**(2): p. 281-94.
5. Zetterberg, H., et al., *Biochemical markers in Alzheimer's disease clinical trials*. Biomark Med, 2010. **4**(1): p. 91-8.
6. Liu, X.A., et al., *Tau Dephosphorylation Potentiates Apoptosis with the Mechanisms Involving a Failed Dephosphorylation/Activation of Bcl-2*. J Alzheimers Dis, 2009.
7. Sager, M.A., et al., *Screening for dementia in community-based memory clinics*. WMJ, 2006. **105**(7): p. 25-9.
8. Jungwirth, S., et al., *Screening for Alzheimer's dementia at age 78 with short psychometric instruments*. Int Psychogeriatr, 2009. **21**(3): p. 548-59.
9. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 741-66.
10. Kang, D.E., et al., *Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease*. Neurology, 1997. **49**(1): p. 56-61.
11. Kehoe, P.G., et al., *The butyrylcholinesterase K variant and susceptibility to Alzheimer's disease*. J Med Genet, 1998. **35**(12): p. 1034-5.
12. Grundke-Iqbal, I., et al., *Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments*. J Biol Chem, 1986. **261**(13): p. 6084-9.
13. Grundke-Iqbal, I., et al., *Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments*. Brain Res, 1988. **464**(1): p. 43-52.
14. Brion, J.P., J. Flament-Durand, and P. Dustin, *Alzheimer's disease and tau proteins*. Lancet, 1986. **2**(8515): p. 1098.
15. Rapoport, S.I., *Coupled reductions in brain oxidative phosphorylation and synaptic function can be quantified and staged in the course of Alzheimer disease*. Neurotoxicity Research, 2003. **5**(6): p. 385-397.
16. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
17. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.
18. Hardy John A., H.G.A., *Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis*. Science, 1992. **256**.

19. Roher, A., E.G. Gray, and M. Paulabarbosa, *Alzheimers-Disease - Coated Vesicles, Coated Pits and the Amyloid-Related Cell*. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 1988. **232**(1269): p. 367-+.
20. Koh, J.Y., L.L. Yang, and C.W. Cotman, *Beta-Amyloid Protein Increases the Vulnerability of Cultured Cortical-Neurons to Excitotoxic Damage*. Brain Research, 1990. **533**(2): p. 315-320.
21. Mattson, M.P., et al., *Beta-Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical-Neurons Vulnerable to Excitotoxicity*. Journal of Neuroscience, 1992. **12**(2): p. 376-389.
22. Eikelenboom, P., et al., *The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease*. J Neural Transm, 2006. **113**(11): p. 1685-95.
23. Heneka, M.T. and M.K. O'Banion, *Inflammatory processes in Alzheimer's disease*. J Neuroimmunol, 2007. **184**(1-2): p. 69-91.
24. Bowen, D.M., et al., *Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies*. Brain, 1976. **99**(3): p. 459-96.
25. Bowen, D.M., N.R. Sims, and A.N. Davison, *Neurochemistry of Alzheimer's disease: an update*. Exp Brain Res, 1982. **Suppl 5**: p. 127-32.
26. Minger, S.L., et al., *Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia*. Neurology, 2000. **55**(10): p. 1460-7.
27. Blass, J.P., *A new approach to treating Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1147**: p. 122-8.
28. Salminen, A., et al., *Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors*. Prog Neurobiol, 2009. **87**(3): p. 181-94.
29. Selkoe, D.J., *Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman*. Neurochem Res, 2003. **28**(11): p. 1705-13.
30. Sokoloff, L., *Relationship between functional activity and energy metabolism in the nervous system: whether, where and why*, in *Brain Work and Mental Activity. Quantitative Studies with Radioactive Tracers*, N.A. Lassen, et al., Editors. 1991: Alfred Benzon Symposium VIII. Munksgaard, Copenhagen. p. 52-67.
31. Rapoport, S.I., *Positron emission tomography in Alzheimer's disease in relation to disease pathogenesis: a critical review*. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1991. **3**: p. 297-335.
32. Rapoport, S.I., *In vivo PET imaging and postmortem studies suggest potentially reversible and irreversible stages of brain metabolic failure in Alzheimer's disease*. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 1999. **249**: p. 46-55.
33. Rapoport, S.I. and C.L. Grady, *Parametric in vivo brain imaging during activation to examine pathological mechanisms of functional failure in Alzheimer disease*. Int J Neurosci, 1993. **70**(1-2): p. 39-56.
34. Rapoport, S.I., et al., *Brain energy metabolism, cognitive function and down-regulated oxidative phosphorylation in Alzheimer disease*. Neurodegeneration, 1996. **5**(4): p. 473-476.
35. Boveris, A. and E. Cadenas, *Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone*. IUBMB Life, 2000. **50**(4-5): p. 245-50.
36. Aichmair, H. and P. Heilig, *[Congenital achromatopsia--generally given little attention as a cause of "bilateral amblyopia"]*. Klin Monatsbl Augenheilkd, 1972. **160**(6): p. 714-6.

37. Luft, R., et al., *A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study.* J Clin Invest, 1962. **41**: p. 1776-804.
38. Nass, S. and M.M. Nass, *Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments.* J Cell Biol, 1963. **19**: p. 613-29.
39. Shy, G.M. and N.K. Gonatas, *Human Myopathy with Giant Abnormal Mitochondria.* Science, 1964. **145**: p. 493-6.
40. Ernster, L., D. Ikkos, and R. Luft, *Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research.* Nature, 1959. **184**: p. 1851-4.
41. Shy, G.M., N.K. Gonatas, and M. Perez, *Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy.* Brain, 1966. **89**(1): p. 133-58.
42. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome.* Nature, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
43. Wallace, D.C., et al., *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy.* Science, 1988. **242**(4884): p. 1427-30.
44. Schon, E.A., E. Bonilla, and S. DiMauro, *Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis.* J Bioenerg Biomembr, 1997. **29**(2): p. 131-49.
45. Wallace, D.C., *Report of the committee on human mitochondrial DNA.* Cytogenet Cell Genet, 1990. **55**(1-4): p. 395-405.
46. McFarland, R. and D.M. Turnbull, *Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease.* J Intern Med, 2009. **265**(2): p. 210-28.
47. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.* Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
48. Trushina, E. and C.T. McMurray, *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.* Neuroscience, 2007. **145**(4): p. 1233-48.
49. Margulis, L., *Genetic and evolutionary consequences of symbiosis.* Exp Parasitol, 1976. **39**(2): p. 277-349.
50. Chinnery, P.F. and E.A. Schon, *Mitochondria.* J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2003 **74**: p. 1188-1199.
51. Lister, R., et al., *Protein import into mitochondria: origins and functions today (review).* Mol Membr Biol, 2005. **22**(1-2): p. 87-100.
52. Gabaldon, T. and M.A. Huynen, *Shaping the mitochondrial proteome.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1659**(2-3): p. 212-20.
53. Margineantu, D.H., et al., *Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines.* Mitochondrion, 2002. **1**(5): p. 425-35.
54. Abramov, A.Y., et al., *Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations.* Brain, 2010. **133**(Pt 3): p. 797-807.
55. Werth, J.L. and S.A. Thayer, *Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons.* J Neurosci, 1994. **14**(1): p. 348-56.
56. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial respiratory-chain diseases.* N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2656-68.
57. DiMauro, S., *Mitochondrial diseases.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1658**(1-2): p. 80-8.
58. Elston, T., H. Wang, and G. Oster, *Energy transduction in ATP synthase.* Nature, 1998. **391**(6666): p. 510-3.

59. Noji, H. and M. Yoshida, *The rotary machine in the cell, ATP synthase*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1665-8.
60. Shoubridge, E.A., *Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(20): p. 2277-84.
61. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Am J Med Genet, 2001. **106**(1): p. 18-26.
62. Brookes, P.S., et al., *Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20474-9.
63. Davies, K.J., *An overview of oxidative stress*. IUBMB Life, 2000. **50**(4-5): p. 241-4.
64. Gilbert D., L.C., C.A., *Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach*. New York, Kluwer Academic, 1999.
65. Halliwell, B., *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J Neurochem, 1992. **59**(5): p. 1609-23.
66. Shigenaga, M.K., T.M. Hagen, and B.N. Ames, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10771-8.
67. Nakamura, H., K. Nakamura, and J. Yodoi, *Redox regulation of cellular activation*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 351-69.
68. Suzuki, Y.J., H.J. Forman, and A. Sevanian, *Oxidants as stimulators of signal transduction*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(1-2): p. 269-85.
69. Burdon, R.H., *Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(4): p. 775-94.
70. Murrell, G.A., M.J. Francis, and L. Bromley, *Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals*. Biochem J, 1990. **265**(3): p. 659-65.
71. Aslund, F. and J. Beckwith, *Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation*. Cell, 1999. **96**(6): p. 751-3.
72. Jakob, U., et al., *Chaperone activity with a redox switch*. Cell, 1999. **96**(3): p. 341-52.
73. Pierce, G.B., R.E. Parchment, and A.L. Lewellyn, *Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst*. Differentiation, 1991. **46**(3): p. 181-6.
74. Lennon, S.V., S.J. Martin, and T.G. Cotter, *Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli*. Cell Prolif, 1991. **24**(2): p. 203-14.
75. Fraga, C.G., et al., *Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4533-7.
76. Stadtman, E.R., *Protein oxidation and aging*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1220-4.
77. Marnett, L.J., et al., *Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104*. Mutat Res, 1985. **148**(1-2): p. 25-34.
78. Davies, K.J., *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochem Soc Symp, 1995. **61**: p. 1-31.
79. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
80. Davies, K.J., *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems*. IUBMB Life, 2000. **50**(4-5): p. 279-89.
81. Cadenas, E., *Biochemistry of oxygen toxicity*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 79-110.
82. Krishnan, K.J., et al., *Mitochondrial DNA mutations and aging*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 227-40.

83. Fleming, J.E., et al., *Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome?* Gerontology, 1982. **28**(1): p. 44-53.
84. Richter, C., J.W. Park, and B.N. Ames, *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(17): p. 6465-7.
85. Mecocci, P., et al., *Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain.* Ann Neurol, 1993. **34**(4): p. 609-16.
86. Clayton, D.A., *Replication of animal mitochondrial DNA.* Cell, 1982. **28**(4): p. 693-705.
87. Linnane, A.W., et al., *Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases.* Lancet, 1989. **1**(8639): p. 642-5.
88. Harman, D., *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 1972. **20**(4): p. 145-7.
89. Fukui, H. and C.T. Moraes, *The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?* Trends in Neurosciences, 2008. **31**(5): p. 251-256.
90. Giles, R.E., et al., *Maternal inheritance of human mitochondrial DNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(11): p. 6715-9.
91. Schwartz, M. and J. Vissing, *Paternal inheritance of mitochondrial DNA.* N Engl J Med, 2002. **347**(8): p. 576-80.
92. Krishnan, K.J., et al., *The ageing mitochondrial genome.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(22): p. 7399-405.
93. Chinnery, P.F., et al., *Clinical mitochondrial genetics.* J Med Genet, 1999. **36**(6): p. 425-36.
94. Hance, N., M.I. Ekstrand, and A. Trifunovic, *Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(13): p. 1775-83.
95. Clayton, D.A., J.N. Doda, and E.C. Friedberg, *The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(7): p. 2777-81.
96. Croteau, D.L., R.H. Stierum, and V.A. Bohr, *Mitochondrial DNA repair pathways.* Mutat Res, 1999. **434**(3): p. 137-48.
97. Krishnan, K.J., et al., *What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?* Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 275-9.
98. DiMauro, S., et al., *Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers.* Adv Neurol, 2002. **89**: p. 217-29.
99. Schon, E.A., A. Naini, and S. Shanske, *Identification of mutations in mtDNA from patients suffering mitochondrial diseases.* Methods Mol Biol, 2002. **197**: p. 55-74.
100. Sutovsky, P., et al., *Ubiquitin tag for sperm mitochondria.* Nature, 1999. **402**(6760): p. 371-2.
101. Bogenhagen, D. and D.A. Clayton, *Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle.* Cell, 1977. **11**(4): p. 719-27.
102. Boulet, L., G. Karpati, and E.A. Shoubridge, *Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF).* Am J Hum Genet, 1992. **51**(6): p. 1187-200.
103. Chomyn, A., et al., *MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change*

- in levels of upstream and downstream mature transcripts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4221-5.
104. Sciacco, M., et al., *Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy.* Hum Mol Genet, 1994. **3**(1): p. 13-9.
 105. Birky, C.W., Jr., *The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models.* Annu Rev Genet, 2001. **35**: p. 125-48.
 106. Brierley, E.J., et al., *Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle.* Ann Neurol, 1998. **43**(2): p. 217-23.
 107. Muller-Hocker, J., et al., *Progressive loss of cytochrome c oxidase in the human extraocular muscles in ageing--a cytochemical-immunohistochemical study.* Mutat Res, 1992. **275**(3-6): p. 115-24.
 108. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease.* Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 515-7.
 109. Taylor, R.W., et al., *Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells.* J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1351-60.
 110. Cottrell, D.A., et al., *Cytochrome c oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age.* Neurobiol Aging, 2001. **22**(2): p. 265-72.
 111. Chinnery, P.F., et al., *The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations.* Ann Neurol, 2000. **48**(2): p. 188-93.
 112. Holt, I.J., A.E. Harding, and J.A. Morgan-Hughes, *Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies.* Nature, 1988. **331**(6158): p. 717-9.
 113. Schaefer, A.M., et al., *Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults.* Ann Neurol, 2008. **63**(1): p. 35-9.
 114. Hudson, G. and P.F. Chinnery, *Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease.* Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 2**: p. R244-52.
 115. Wanrooij, S., et al., *Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(10): p. 3053-64.
 116. Corral-Debrinski, M., et al., *Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age.* Nat Genet, 1992. **2**(4): p. 324-9.
 117. Kravtsov, Y., et al., *Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons.* Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 518-20.
 118. Bua, E., et al., *Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers.* Am J Hum Genet, 2006. **79**(3): p. 469-80.
 119. Samuels, D.C., E.A. Schon, and P.F. Chinnery, *Two direct repeats cause most human mtDNA deletions.* Trends Genet, 2004. **20**(9): p. 393-8.
 120. Morrison, P.J., *Trinucleotide repeat repeat repeat.* Lancet, 1993. **342**(8868): p. 385-6.
 121. Richards, R.I. and G.R. Sutherland, *Repeat offenders: simple repeat sequences and complex genetic problems.* Hum Mutat, 1996. **8**(1): p. 1-7.
 122. Horiguchi, M., et al., *Molecular nature of ultraviolet B light-induced deletions in the murine epidermis.* Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 3913-8.
 123. Sargentini, N.J. and K.C. Smith, *Involvement of RecB-mediated (but not RecF-mediated) repair of DNA double-strand breaks in the gamma-radiation production of long deletions in Escherichia coli.* Mutat Res, 1992. **265**(1): p. 83-101.

124. Thacker, J., et al., *A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts: the involvement of short sequence repeats*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(23): p. 6183-8.
125. Haber, J.E., *Partners and pathways repairing a double-strand break*. Trends Genet, 2000. **16**(6): p. 259-64.
126. Reeve, A.K., et al., *Nature of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(1): p. 228-35.
127. Corral-Debrinski, M., et al., *Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease*. Mutat Res, 1992. **275**(3-6): p. 169-80.
128. Cortopassi, G.A., et al., *A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7370-4.
129. Soong, N.W., et al., *Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain*. Nat Genet, 1992. **2**(4): p. 318-23.
130. Rubner, M., *Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehung zu Wachstum und Ernährung*. Munich:Oldenburg, 1908.
131. Gerschman, R., et al., *Influence of x-irradiation on oxygen poisoning in mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1954. **86**(1): p. 27-9.
132. Muller, F.L., et al., *Trends in oxidative aging theories*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(4): p. 477-503.
133. Levy, L. and S. Luft, *Healing in an uncontrolled diabetic following severe infection and spontaneous amputation of the fifth toe*. J Am Podiatry Assoc, 1962. **52**: p. 836-7.
134. Hedman, R., et al., *Oxidation of external DPNH by mitochondria from human and rat skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 1962. **8**: p. 314-20.
135. Lovelace, W.R., 2nd, et al., *Selection and maintenance program for astronauts for the National Aeronautics and Space Administration*. Aerosp Med, 1962. **33**: p. 667-84.
136. Cardus, D., et al., *Considerations on appraisal of physical fitness*. Arch Phys Med Rehabil, 1962. **43**: p. 222-7.
137. Kovalenko, S.A., et al., *Tissue-specific distribution of multiple mitochondrial DNA rearrangements during human aging*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 171-81.
138. Cortopassi, G.A. and N. Arnheim, *Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(23): p. 6927-33.
139. Lee, C.M., et al., *Multiple mitochondrial DNA deletions associated with age in skeletal muscle of rhesus monkeys*. J Gerontol, 1993. **48**(6): p. B201-5.
140. Manfredi, G., et al., *Association of myopathy with large-scale mitochondrial DNA duplications and deletions: which is pathogenic?* Ann Neurol, 1997. **42**(2): p. 180-8.
141. Golden, T.R. and S. Melov, *Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(14): p. 1577-89.
142. DiMauro, S. and M. Hirano, *Neurological diseases due to mitochondrial DNA mutations: concepts and problems in pathogenesis*. Int J Neurol, 1991. **25-26**: p. 118-29.
143. Corral-Debrinski, M., et al., *Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains*. Genomics, 1994. **23**(2): p. 471-6.
144. Lezza, A.M., et al., *Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients*. FASEB J, 1999. **13**(9): p. 1083-8.
145. Bonilla, E., et al., *Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1410**(2): p. 171-82.

146. Atamna, H. and W.H. Frey, 2nd, *Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease*. Mitochondrion, 2007. **7**(5): p. 297-310.
147. Hauptmann, S., et al., *Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease*. Exp Gerontol, 2006. **41**(7): p. 668-73.
148. Reddy, P.H., *Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(10): p. 1647-58.
149. Wang, X., et al., *Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(12): p. 1569-73.
150. Anandatheerthavarada, H.K., et al., *Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells*. J Cell Biol, 2003. **161**(1): p. 41-54.
151. Lustbader, J.W., et al., *ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease*. Science, 2004. **304**(5669): p. 448-52.
152. Manczak, M., et al., *Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(9): p. 1437-49.
153. Cottrell, D.A., et al., *Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD*. Neurology, 2001. **57**(2): p. 260-4.
154. Cottrell, D.A., et al., *The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2002. **28**(5): p. 390-6.
155. Fukui, H., et al., *Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14163-8.
156. Cottrell, D.A., et al., *Role of mitochondrial DNA mutations in disease and aging*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **908**: p. 199-207.
157. Hamblet, N.S. and F.J. Castora, *Elevated levels of the Kearns-Sayre syndrome mitochondrial DNA deletion in temporal cortex of Alzheimer's patients*. Mutat Res, 1997. **379**(2): p. 253-62.
158. Coskun, P.E., M.F. Beal, and D.C. Wallace, *Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10726-31.
159. Manczak, M., et al., *Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage*. Neuromolecular Med, 2004. **5**(2): p. 147-62.
160. Ginzinger, D.G., *Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream*. Exp Hematol, 2002. **30**(6): p. 503-12.
161. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
162. Lee, S.P., et al., *Characterization of Mg(2+)-dependent 3'-processing activity for human immunodeficiency virus type 1 integrase in vitro: real-time kinetic studies using fluorescence resonance energy transfer*. Biochemistry, 1995. **34**(32): p. 10205-14.
163. Cardullo, R.A., et al., *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(23): p. 8790-4.

164. Selvin, P.R. and J.E. Hearst, *Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 10024-8.
165. Lie, Y.S. and C.J. Petropoulos, *Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(1): p. 43-8.
166. Walker, N.J., *Tech.Sight. A technique whose time has come*. Science, 2002. **296**(5567): p. 557-9.
167. Biosystems, A., *Essentials of Real Time PCR*. www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_039996.pdf: p. 2.
168. Ishiguro, T., et al., *Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater*. Anal Biochem, 1995. **229**(2): p. 207-13.
169. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
170. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
171. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
172. He, L., et al., *Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. e68.
173. McNeill, T.H., et al., *Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson's disease*. Brain Res, 1988. **455**(1): p. 148-52.
174. Prionforschung, B.-N.-D.R.f.E.d.Z.a.Z.f.N.u., <http://www.brain-net.net>.
175. Nissl, F., *Über eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen*. Neurologisches Centralblatt Leipzig, 1894. **13**(507-508).
176. Nissl, F., *Über die sogenannten Granula der Nervenzellen* Neurologisches Centralblatt Leipzig, 1894. **13**: p. 676-685; 781-789; 810-814.
177. Uylings, H.B., K. Zilles, and G. Rajkowska, *Optimal staining methods for delineation of cortical areas and neuron counts in human brains*. Neuroimage, 1999. **9**(4): p. 439-45.
178. Gittins, R. and P.J. Harrison, *Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining*. Brain Res Bull, 2004. **63**(2): p. 155-60.
179. Srinivasan, R. and V. Mayen-Banton, *Self-developing photoetching of poly(ethylene terephthalate) films by far-ultraviolet excimer laser radiation*. Appl.Phys.Lett., 1982. **41**(576).
180. Microsystems, L., <http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/life-science-research/laser-microdissection>.
181. Bender, A., et al., *Creatine improves health and survival of mice*. Neurobiol Aging, 2008. **29**(9): p. 1404-11.
182. Database, M.A.H.M.G., Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA, 2001. <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>.
183. Hirsch, E., A.M. Graybiel, and Y.A. Agid, *Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease*. Nature, 1988. **334**(6180): p. 345-8.

184. Braak, H., E. Braak, and J. Bohl, *Staging of Alzheimer-related cortical destruction*. Eur Neurol, 1993. **33**(6): p. 403-8.
185. Cohen, G., R. Farooqui, and N. Kesler, *Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 4890-4.
186. Yamato, M., et al., *Determination of reactive oxygen species associated with the degeneration of dopaminergic neurons during dopamine metabolism*. Free Radic Res, 2009.
187. Weinberg, A., et al., *Prevention of catecholaminergic oxidative toxicity by 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl and its recycling complex with polynitroxylated albumin, TEMPOL/PNA*. Brain Res, 2004. **1012**(1-2): p. 13-21.
188. Hastings, T.G., D.A. Lewis, and M.J. Zigmond, *Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease*. Adv Exp Med Biol, 1996. **387**: p. 97-106.
189. Hastings, T.G. and M.J. Zigmond, *Loss of dopaminergic neurons in parkinsonism: possible role of reactive dopamine metabolites*. J Neural Transm Suppl, 1997. **49**: p. 103-10.
190. Jenner, P. and C.W. Olanow, *Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease*. Neurology, 1996. **47**(6 Suppl 3): p. S161-70.
191. Freestone, P.S., et al., *Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons - involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca homeostasis*. Eur J Neurosci, 2009.
192. Meurers, B.H., et al., *Low dose rotenone treatment causes selective transcriptional activation of cell death related pathways in dopaminergic neurons in vivo*. Neurobiol Dis, 2009. **33**(2): p. 182-92.
193. Brenner-Lavie, H., et al., *Dopamine modulates mitochondrial function in viable SH-SY5Y cells possibly via its interaction with complex I: relevance to dopamine pathology in schizophrenia*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(2): p. 173-85.
194. Ben-Shachar, D., et al., *Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(10): p. 1965-74.
195. Gluck, M., et al., *Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine: involvement of H₂O₂ and hydroxyl radicals but not glutathione-protein-mixed disulfides*. J Neurochem, 2002. **82**(1): p. 66-74.
196. Khan, F.H., et al., *Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: implications for Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1741**(1-2): p. 65-74.
197. Davey, G.P., S. Peuchen, and J.B. Clark, *Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 12753-7.
198. Youdim, M.B., D. Ben-Shachar, and P. Riederer, *The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra*. J Neural Transm Suppl, 1994. **43**: p. 113-22.
199. Offen, D., et al., *Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease*. Neurochem Int, 1997. **31**(2): p. 207-16.
200. Double, K.L., et al., *Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra*. Neurotoxicol Teratol, 2002. **24**(5): p. 621-8.

201. Zecca, L., et al., *The neuromelanin of human substantia nigra: structure, synthesis and molecular behaviour*. J Neural Transm Suppl, 2003(65): p. 145-55.
202. Zecca, L., et al., *The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9843-8.
203. Shamoto-Nagai, M., et al., *Neuromelanin induces oxidative stress in mitochondria through release of iron: mechanism behind the inhibition of 26S proteasome*. J Neural Transm, 2006. **113**(5): p. 633-44.
204. Zecca, L., et al., *Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(11): p. 863-73.
205. Galpern, W.R. and A.E. Lang, *Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 449-58.
206. Molsa, P.K., R.J. Marttila, and U.K. Rinne, *Extrapyramidal signs in Alzheimer's disease*. Neurology, 1984. **34**(8): p. 1114-6.
207. Ellis, R.J., et al., *Extrapyramidal motor signs in clinically diagnosed Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1996. **10**(2): p. 103-14.
208. Fasano, M., B. Bergamasco, and L. Lopiano, *Modifications of the iron-neuromelanin system in Parkinson's disease*. J Neurochem, 2006. **96**(4): p. 909-16.
209. Zecca, L. and H.M. Swartz, *Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin*. J Neural Transm Park Dis Dement Sect, 1993. **5**(3): p. 203-13.
210. Itoh, K., et al., *Cytochrome c oxidase defects of the human substantia nigra in normal aging*. Neurobiol Aging, 1996. **17**(6): p. 843-8.
211. Greene, J.G., R. Dingledine, and J.T. Greenamyre, *Gene expression profiling of rat midbrain dopamine neurons: implications for selective vulnerability in parkinsonism*. Neurobiol Dis, 2005. **18**(1): p. 19-31.
212. Muller, F.L., Y. Liu, and H. Van Remmen, *Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49064-73.
213. Chinnery, P.F. and D.M. Turnbull, *Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease*. Mol Med Today, 2000. **6**(11): p. 425-32.
214. Brenner-Lavie, H., E. Klein, and D. Ben-Shachar, *Mitochondrial complex I as a novel target for intraneuronal DA: Modulation of respiration in intact cells*. Biochemical Pharmacology, 2009. **78**(1): p. 85-95.
215. Ben-Shachar, D., *Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine*. J Neurochem, 2002. **83**(6): p. 1241-51.
216. Khrapko, K. and J. Vijg, *Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details?* Trends Genet, 2009. **25**(2): p. 91-8.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 [57]: Schematische Zeichnung der Atmungskette.	14
Abbildung 2 [89]: Schematischer Überblick über die Beziehung von OXPHOS - oxidativem Stress und Neurodegeneration.	18
Abbildung 3 [93] : Die mtDNA.	20
Abbildung 4 [61]: Skizze der menschlichen mtDNA.	24
Abbildung 5: Der FRET-Effekt.	30
Abbildung 6 [167]: Das Double-Dye-Sonden-Prinzip.	31
Abbildung 7: Amplifikationsgrafik der quantitativen real-time PCR.	32
Abbildung 8 [180]: Schematisches Prinzip der Lasermikrodissektion.	54
Abbildung 9: Lasermikrodissektionsgerät von Leica.	55
Abbildung 10: Gewebeprobe FC in 40-facher Vergrößerung.	56
Abbildung 11: Gewebeprobe SN, 6-fache Vergrößerung.	57
Abbildung 12: Gewebeprobe, Substantia nigra, 63-fache Vergrößerung.	58
Abbildung 13: Gewebeprobe SN nach Dissektion in 20- facher Vergrößerung.	59
Abbildung 14: Einzelneuronen aus dem FC im Sammelgefäß.	60
Abbildung 15: Einzelzelle aus dem FC im Sammelgefäß in 40-facher Vergrößerung.	60
Abbildung 16 [118, 172]: Das mitochondriale Genom.	65
Abbildung 17: Screenshot der real-time PCR-Amplifikation.	72
Abbildung 18: Ergebnisse der Deletionsquantifizierung.	75

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis der Chemikalien für die Kryodünnschnitte	37
Tabelle 2: Verzeichnis der Chemikalien für die Färbung nach Nissl	38
Tabelle 3: Verzeichnis der Chemikalien für die Extraktion der mt-DNA der dissektierten Neurone	39
Tabelle 4: Verzeichnis der Chemikalien für die rt-PCR	39
Tabelle 5: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel der Kryokonservierung	40
Tabelle 6: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die Färbung nach Nissl.....	41
Tabelle 7: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die Lasermikrodissektion	42
Tabelle 8: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die Extraktion der mt-DNA.....	43
Tabelle 9: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die rt-PCR.....	43
Tabelle 10: Verzeichnis der Geräte und Hilfsmittel für die statistische Auswertung	45
Tabelle 11: Verzeichnis der Gewebe von Alzheimerkohorte und Kontrollgruppe.....	47
Tabelle 12: Patienten- und Kontrollgruppe: Anzahl, Alter und Post-Mortem-Intervall	48
Tabelle 13: Tabellarisches Protokoll der Mastermix-Zubereitung	67

9 Abkürzungsverzeichnis

A β P:	β -Amyloid
ANOVA:	Analysis of variance
APP:	Amyloid-Precursor-Protein
ATP:	Adenosyltriphosphat
BSA:	Bovine serum albumin
Bp:	Basenpaare
C10orf2:	Chromosome 10 open reading frame 2
CAT:	Cholinacetyltransferase
COX:	Cytochromoxidase
CoQ:	Coenzym Q 10 (Ubiquinon)
CPEO:	Chronic progressive external opthalmoplegia
CT:	Cycle threshold
CTP:	Cytosyltriphosphat
dH ₂ O:	destilliertes Wasser
DNA:	Desoxyribonucleic acid
EEG:	Elektroenzephalogramm
FAD:	Flavin Adenin Dinukleotid
FC:	Frontaler Kortex
FAM:	6-Carboxy-Fluoreszin
FRET:	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSBN:	Familial striatal bilateral necrosis
FC:	Frontaler Kortex (frontal cortex)
GTP:	Guanosyltriphosphat
H ₂ O:	Wasser
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HCL:	Hydroxychlorid
HO•:	Hydroxyl-Radikal
Kb:	Kilobasen
KSS:	Kearns-Sayre-Syndrom
LED:	Licht emittierende Diode
LMD:	Laser-Mikro-Dissektion
LHON:	Leber hereditary optic neuropathy
M.:	Morbus
mM:	Millimol
MAO:	Monoaminoxidase
MELAS:	encephalomyopathy, lactic acidosis and strokelike episodes
MERRF:	Myoclinic epilepsy with ragged red fibers
MILS:	Maternally inherited Leigh-syndrome
Mt:	Mitochondrial
mtDNA:	Mitochondriale DNA
μ m:	Mikrometer
NAD:	Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NADH:	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Hydroxid
NARP:	Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa

nm:	Nanometer
ns:	Nanosekunden
mtND1:	mitochondriale NADH-Dehydrogenase 1
mtND4:	mitochondriale NADH-Dehydrogenase 4
OH:	Origin of the heavy strand replication
OL:	Origin of the light strand replication
O ₂ :	Sauerstoff
O ₂ •:	Sauerstoff-Radikal
¹ O ₂ :	Singulett-Sauerstoff
OXPPOS:	Oxidative Phosphorylation
PCR:	Polymerasekettenreaktion
PEO:	Progressive external ophtalmoplegia
Pm:	Post mortem
Pmol:	Picomol
PET:	Positronenemissionstomographie
POLG:	Polymerase Gamma
Put:	Putamen
ROS:	Reactive oxygen species
RNA:	Ribonucleic acid
Rpm:	rounds per minute
rt-PCR:	Real-Time Polymerasekettenreaktion
SDH:	Succinatdehydrogenase
SN:	Substantia nigra
TAMRA:	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TAU:	
TRIS:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP:	Uracyltriposphat
UV:	Ultraviolett
Δ:	Delta

10 Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Andreas Bender möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders herzlich bedanken. Er betreute diese Arbeit von Anfang an und unterstützte mich mit konstruktiven Ideen und Ratschlägen, sowohl bei der Planung und Durchführung, als auch bei der Zusammenfassung unserer Ergebnisse. Er zeigte sich als wertvoller Diskussionspartner – in diesen Stunden habe ich viel gelernt. Insbesondere gebührt ihm Dank für die Vertretung dieser Arbeit gegenüber der medizinischen Fakultät, sowie der Universität.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Klopstock, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit begonnen wurde. Stets stand er unterstützend und beratend zur Seite. Er ermöglichte mir die Einarbeitung in ein spannendes und aktuelles Feld der Neurogenetik.

Frau Dr. Melanie Neumann vom pathologischen Institut möchte ich für die wertvolle Beratung bei der Anfertigung der Gewebsschnitte danken.

Frau Dr. Gabriele Rieder, Mitarbeiterin des Max-von-Pettenkofer-Instituts der LMU München, war als Ansprechpartnerin eine wertvolle Unterstützung. Sie ermöglichte mir den ersten Kontakt mit der neuen Technik der LMD und zeigte sich stets hilfsbereit und kooperativ.

Frau Franziska Anneser stand mir stets beratend zur Seite und war immer mit Tricks und Tipps zur Hand – sei es bei der DNA-Extraktion oder beim Anmischen von Puffern und Lösungen. Ihrer praktischen Erfahrung habe ich viel zu verdanken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Kommilitonin, Frau Anja McMillan für ihre Freundschaft und die enge Zusammenarbeit ganz herzlich danken!