

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Frau Prof. Dr. med. M. Dieterich

Deletionen der mitochondrialen DNA im Alterungsprozess

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph Benedict Laub
aus
München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Andreas Bender

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Kai Hell

PD Dr. med. Markus J. Schwarz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2012

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	4
1.1	Das Mitochondrium	4
1.1.1	Entwicklung der Mitochondrien	4
1.1.2	Reaktionen der Atmungskette	5
1.2	Das mitochondriale Genom	7
1.2.1	Struktur der mtDNA	7
1.2.2	Genprodukte der mtDNA	8
1.2.3	Vererbung der mtDNA	9
1.2.4	Replikation der mtDNA	10
1.3	Mutationen der mtDNA	11
1.3.1	Mitochondriale Erkrankungen	11
1.3.2	Somatische Mutationen	14
1.4	Die mitochondriale Theorie des Alterns	16
1.4.1	Der Alterungsprozess	16
1.4.2	Entwicklung der Theorie	17
1.4.3	Oxidativer Stress	18
1.4.4	COX-Defizienz und Mutationen der mtDNA	20
2.	Zielsetzung	21
3.	Material und Methoden	22
3.1	Gewebeproben und histologische Präparation	22
3.2	Färbungen	23
3.2.1	COX-SDH-Färbung	23
3.2.2	Anti-NeuN-Färbung	26
3.3	Lasermikrodissektion	28
3.4	Isolierung der DNA	29
3.5	PCR-Methoden	30
3.5.1	Prinzip der PCR	30
3.5.2	Long-Range-nested PCR	30
3.5.3	Quantitative Real-time PCR	35
3.6	Bestimmung der Häufigkeit COX-defizienter Zellen	41

3.7	Statistik	42
3.7.1	Quantifizierung COX-defizienter Myozyten	42
3.7.2	Vergleich COX-defizienter Myozyten mit COX-normalen Myozyten	42
3.7.3	Deletionen der mtDNA mit zunehmendem Alter	43
3.7.4	Untersuchung der mtDNA-Kopienzahlen	44
4.	Ergebnisse	45
4.1	Untersuchung COX-defizienter Myozyten	45
4.1.1	Quantifizierung der Häufigkeit COX-defizienter Myozyten	45
4.1.2	COX-Defizienz in verschiedenen Muskelgeweben	46
4.1.3	COX-Defizienz und Deletionen der mtDNA	47
4.2	Deletionen der mtDNA im Alterungsprozess	50
4.2.1	Korrelation zwischen Alter und Δ mtDNA-Anteil	50
4.2.2	Vergleich des Δ mtDNA-Anteils in verschiedenen Geweben	53
4.3	Alters- und gewebeabhängige Unterschiede der mtDNA-Kopienzahlen	54
4.3.1	mtDNA-Kopienzahlen mit zunehmendem Alter	54
4.3.2	mtDNA-Kopienzahlen in unterschiedlichen Geweben	56
5.	Diskussion	58
5.1	Deletionen der mtDNA und Funktionsstörungen der Atmungskette	58
5.1.1	COX-Defizienz im Alterungsprozess	58
5.1.2	Deletionen der mtDNA im Alterungsprozess	58
5.1.3	Gewebeunterschiede und mitochondriale Proliferation	60
5.1.4	Besonderheiten der äußeren Augenmuskulatur	64
5.2	Einordnung der verwendeten Methoden	65
5.3	Möglichkeiten einer therapeutischen Nutzung	66
5.3.1	Pharmakotherapie und Nahrungsergänzung	67
5.3.2	Lebensverlängerung durch Kalorienrestriktion	68
5.4	Abschließende Bewertung der untersuchten Hypothesen	69
6.	Zusammenfassung	70

7.	Anhang	72
7.1	Literaturverzeichnis	72
7.2	Abkürzungsverzeichnis	88
7.3	Danksagung	90

1 Einleitung

1.1 Das Mitochondrium

Mitochondrien finden sich in jeder Zelle des menschlichen Körpers. Es sind tubulär verzweigt aufgebaute Organellen, umgeben von zwei Elementarmembranen, die die mitochondriale Matrix vom Zytosol der Umgebung abgrenzen. Die äußere Membran umschließt glatt das Mitochondrium und ist von zahlreichen Transportproteinen, den Porinen, durchsetzt [1]. Durch diese können große Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ca. 10000 kD die Membran durchdringen. Die gefaltete innere Mitochondrienmembran ist für Ionen und die meisten Moleküle undurchlässig, enthält aber komplexe Transportsysteme. Zwischen den beiden Membranen liegt der Intermembranspalt, innerhalb der inneren Membran die mitochondriale Matrix. In der Matrix findet sich neben vielen Enzymen die ringförmige mitochondriale DNA (mtDNA). Die Funktionen der Mitochondrien innerhalb des Stoffwechsels sind vielfältig, sie sind in die Homöostase der Zelle in verschiedenster Weise eingebunden. Sie sind ebenso am Stoffwechsel der Aminosäuren, der Lipide, insbesondere des Cholesterins und der Steroide, wie am Stoffwechsel der Nukleotide beteiligt [2]. Ihre wichtigste Funktion ist jedoch die Energiebereitstellung. Die mitochondriale Matrix und die innere Membran enthalten sämtliche Enzyme der β -Oxidation, des Citratzyklus und der Atmungskette, ebenso wie die Pyruvat-Dehydrogenase. Fast der gesamte zelluläre Energiebedarf wird durch die Mitochondrien gedeckt [3]. Die biochemischen, morphologischen und physiologischen Eigenschaften der Mitochondrien sind von Organ zu Organ und selbst von Zelle zu Zelle sehr heterogen. Auch die Anzahl der Mitochondrien in einer Zelle ist sehr variabel, abhängig von der Zellart und dem momentanen Bedarf der Zelle. Dabei bilden die Mitochondrien ein dynamisches Netzwerk, das sich ständig in Ausdehnung und Form verändert [4].

1.1.1 Entwicklung der Mitochondrien

Die einzigartigen Eigenschaften der Mitochondrien, insbesondere das Vorhandensein einer eigenen, von der nukleären DNA unabhängigen mtDNA) führten zu Überlegungen, wie in der Zelle eine teilweise so eigenständige Zellorganelle entstehen konnte. Im 19. Jahrhundert wurden die Grundgedanken der Endosymbiontentheorie entwickelt [5]. Diese kann man kurz folgendermaßen zusammen-

fassen: Eine primitive Eukaryontenzelle (mit Zellkern, Chromosomen, internem Membransystem und Zytoskelett) nimmt ein Bakterium, genauer ein α -Protobakterium, auf, das dann allmählich Gene verliert, seine Struktur verändert und die Fähigkeit zur Vermehrung verliert [6, 7]. Man könnte auch alternativ annehmen, dass die Urzelle die typischen eukaryotischen Merkmale (Kern, zytoplasmatisches Membransystem, Zytoskelett) erst parallel zu der Aufnahme des Bakteriums entwickelt. In jedem Fall verändert sich das symbiotische Zusammenleben, viele prokaryotische Gene gehen verloren, andere gelangten in das nukleäre Genom. Als Spuren dieses Prozesses werden die Ähnlichkeiten langer Abschnitte des nukleären Genoms mit dem mitochondrialen Genom angesehen. Die Endosymbiontentheorie wurde im Lauf der Jahre mehr und mehr zu der Theorie der seriellen Endosymbiose (SET von „serial endosymbiosis theory“) erweitert [8], worin auch andere Zellorganellen (z.B. Chloroplasten) diesem Entstehungsmechanismus zugeschrieben werden. In den letzten Jahren kamen aber auch Zweifel an diesen Theorien auf. Es fanden sich überraschend wenig neue Forschungsergebnisse, die diese Theorie unterstützen, bzw. fand man Ergebnisse, die mit der Endosymbiontentheorie nicht erklärt werden können [9].

1.1.2 Reaktionen der Atmungskette

Mitochondrien sind an mehreren Prozessen des Energiestoffwechsels (β -Oxidation, Citratzyklus) beteiligt, gemeinsame Endstrecke der Energiegewinnung ist aber die Atmungskette. An der inneren Mitochondrienmembran ist die Reihe der 5 Enzymkomplexe der Atmungskette lokalisiert. Sie bildet eine Kette von Redoxstufen, die im Stoffwechsel der Zelle entstandene Elektronen auf Sauerstoff (O_2) übertragen und dabei einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufbauen (Abb.1.1). Der Gradient ermöglicht die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat [10]. Reduktionsäquivalente ($NADH$ und $FADH_2$) aus der Glykolyse, dem Citratzyklus und der β -Oxidation geben ihre Elektronen (als Wasserstoff) an verschiedenen Stellen der Atmungskette ab. Der Elektronentransfer der Atmungskette wird durch verschiedene prosthetische Gruppen ermöglicht, beispielsweise Eisen-Schwefel-Komplexe in Komplex I, II und III oder Häm-Eisen in Cytochrom C und Komplex IV. Auf Komplex I, der $NADH$ -Dehydrogenase, werden die Elektronen aller $NADH$ -Moleküle übertragen. Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase (SDH), erhält Elektronen aus $FADH_2$. Ein dritter Lieferant von Elektronen in Form von Wasserstoff ist das Elektronentransferierende Flavopro-

tein, das weitere Elektronen aus der β -Oxidation einspeist.

Nach dem Einbringen der Elektronen in die Atmungskette wird in einem zweiten Schritt das lipophile Molekül Ubichinon (auch Coenzym Q genannt) durch die Übertragung der Wasserstoffatome zu Ubichinol reduziert. Ubichinol gibt die Elektronen an Komplex III, die Cytochrom-C-Reduktase, weiter, diese wiederum überträgt sie auf Cytochrom C. Das bewegliche und wasserlösliche Protein Cytochrom C transportiert die Elektronen an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran zu Komplex IV, der Cytochrom-Oxidase (COX). Die COX katalysiert die letzte Reaktion, die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser.

Die bei der Weitergabe der Elektronen in der Atmungskette frei werdende Energie wird von Komplex I, III und IV dazu genutzt, Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu verschieben. Dieser Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran bildet den Großteil des mitochondrialen Membranpotentials, ein kleinerer Anteil wird durch die asymmetrische Verteilung von Ionen wie Na^+ , K^+ oder Ca^{2+} gebildet. Der Protonengradient wird vom Komplex V, der ATP-Synthase, zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt. Der Vorgang wird auch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) genannt. Das synthetisierte ATP kann nun für alle aktiven Stoffwechselfvorgänge verwendet werden.

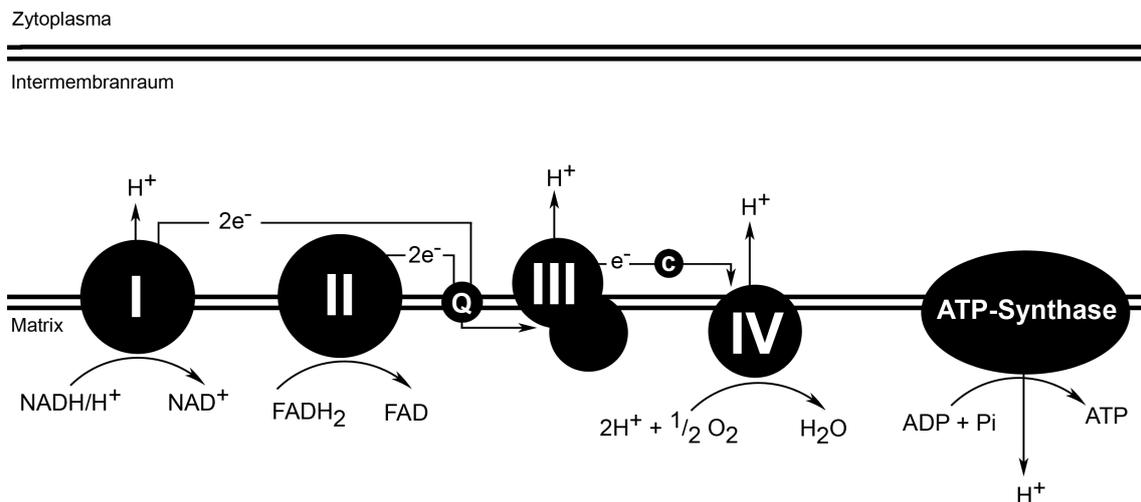


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran

1.2 Das mitochondriale Genom

Das Mitochondrium stellt eine Besonderheit unter den Zellorganellen der menschlichen Zelle dar: Es besitzt ein eigenes Genom, ein doppelsträngiges ringförmiges DNA Molekül, das 16569 Basenpaare (bp) lang ist. Im Jahre 1963 entdeckten Nass und Nass die mtDNA [11]. 1981 veröffentlichten Anderson et al. die Sequenz des mitochondrialen Genoms [12]. Jedes Säugetier-Mitochondrium enthält etwa 0-21 mtDNA Moleküle, gemessen mit Fluoreszenz-Mikroskopie [13] und PCR [14]. In einer Zelle mit 300 bis 2000 Mitochondrien können sich also mehrere tausend Kopien der mtDNA befinden.

1.2.1 Struktur der mtDNA

Man unterscheidet bei den beiden komplementären DNA-Strängen der mtDNA einen H-Strang (H von „heavy“) und einen L-Strang (L von „light“). Die Bezeichnungen leiten sich aus den unterschiedlichen Auftriebsdichten bei der isopyknischen Zentrifugation im CsCL-Gleichgewichtsgradienten her. Hier kann man den schweren („heavy“) vom leichten („Light“) Strang trennen. Die Startpunkte der Replikation des H- und des L-Strangs bezeichnet man nach „origin of replication“ als O_H und O_L . Die beiden Punkte sind wichtige Orientierungspunkte der ringförmigen mtDNA. Den Abschnitt von O_H im Urzeigersinn bis zu O_L bezeichnet man als großen Bogen, den folgenden Abschnitt von O_L bis zu O_H als kleinen Bogen (siehe Abb.1.2)

Die mtDNA enthält keine Introns. Die genetische Information liegt mit einer Gendichte von einem Gen pro 0,45 kb in sehr komprimierter Form vor (im Vergleich dazu beträgt die Gendichte im nukleären Genom ein Gen pro 40 kb) [15]. Die mtDNA kodiert für 13 Proteine, alle Bestandteile der Atmungskette, und 24 RNA Bestandteile (22 tRNAs und 2 rRNAs), die für die mitochondriale Proteinsynthese von Bedeutung sind [16]. Die meisten mitochondrialen Proteine sind aber nukleär kodiert und werden über spezifische Transporter (z.B. TIM und TOM) in das Mitochondrium transportiert [17].

Eine 1221 bp lange, nicht kodierende, Region um O_H wird als „displacement-loop“ (D-loop) Region bezeichnet. Hier liegen die beiden Stränge der mtDNA zeitweise getrennt durch einen dritten Strang vor. Die Region spielt in der Regulierung von Transkription und Replikation der mtDNA eine große Rolle. So liegen beispielsweise die Promotoren beider Stränge in diesem Bereich und die Replikation der mtDNA startet dort [18].

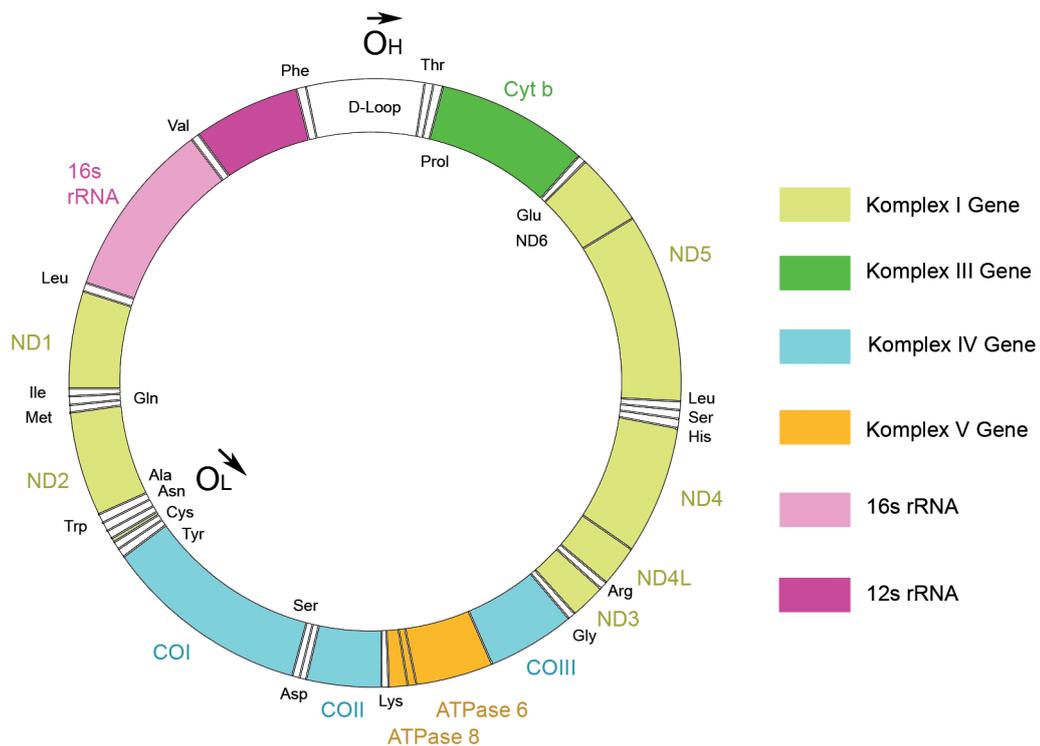


Abbildung 1.2: Struktur der mitochondrialen DNA. Die Gene der Komplexe der Atmungskette und die Gene der ribosomalen RNA sind mit verschiedenen Farben markiert. Die tRNA Gene sind mit der Abkürzung der zugehörigen Aminosäure bezeichnet. Die Abkürzungen der proteinkodierenden Gene bezeichnen die Untereinheit des jeweiligen Atmungsketten-Komplexes (nach [19]).

1.2.2 Genprodukte der mtDNA

Mit der Sequenzierung der mtDNA begann die genauere Betrachtung der Genprodukte der mtDNA [12]. Der Vergleich der Gensequenz mit den Sequenzen der Aminosäuren der kodierten Proteine ergab überraschenderweise eine abweichende Kodierung mancher Codons der mtDNA von der nukleären DNA (nDNA), beispielsweise ist das Codon „UGA“ im allgemeinen ein Stoppcodon, in der mtDNA aber kodiert es für die Aminosäure Tryptophan. Man erklärt sich die Abweichung vom eigentlich universellen Code durch zufällige Mutationen, die aufgrund der geringen Zahl an Genprodukten nicht zur Zerstörung der Zelle führen, und somit ein weiterbestehen der Variation ermöglicht [20]

Die meisten der mtDNA Gene liegen auf dem H-Strang. Je ein Gen für die 12S- und für die 16S-rRNA, 14 Gene für tRNAs und 12 proteinkodierende Gene. Auf

dem L-Strang liegen 8 tRNA-Gene, und 1 proteinkodierendes Gen (ND6). Zunächst eine etwas genauere Betrachtung der proteinkodierenden Gene (siehe auch Abb.1): Die Gene ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 und ND6 kodieren für Bestandteile der NADH-Dehydrogenase (Komplex I). Komplex I besteht aus 39 Untereinheiten, 7 sind mitochondrial, 32 nukleär kodiert. Das Gen Cyt b kodiert einen Baustein der Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III, insgesamt 10 Untereinheiten), die restlichen 9 Untereinheiten sind nukleär kodiert. Die Gene CO I, CO II und CO III kodieren für 3 Untereinheiten der Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV). Bei insgesamt 13 Untereinheiten sind die restlichen 10 Untereinheiten nukleär kodiert. Schließlich kodieren die Gene ATPase 6 und ATPase 8 für 2 von 12 Untereinheiten der ATP-Synthase. Bei der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) sind alle 4 Untereinheiten nukleär kodiert [21]. In Abb.1.2 ist zu erkennen, dass kurze Gene für tRNAs über die ganze mtDNA verteilt sind. Sie sind in der Abbildung mit der jeweilig Aminosäure-spezifischen Abkürzung bezeichnet. Die beiden rRNA Gene sind nahe dem OH zu finden. Das mitochondriale Genom kodiert, neben den Untereinheiten der Enzyme der Atmungskette, also auch für Bestandteile des eigenen Translationsapparats, für die ribosomale RNA und für alle benötigten tRNAs. Die mitochondriale Proteinsynthese benötigt aufgrund einer gelockerten Codon Nutzung nur 22 tRNAs. Nukleär kodiert sind die ribosomalen Proteine, alle Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (die mitochondriale tRNAs mit Aminosäuren beladen) sowie die RNA Polymerase und ihre Transkriptionsfaktoren [22]. Es muss also für die mitochondriale Transkription und Translation eine enge funktionelle Verbindung zwischen Zellkern und Mitochondrium bestehen. Diese und andere Interaktionen zwischen mtDNA und nDNA beginnt man erst allmählich zu verstehen. Man untersucht beispielsweise so genannte „Cybrid“ Zellen, die mtDNA und nDNA unterschiedlicher Herkunft enthalten [23].

1.2.3 Vererbung des mitochondrialen Genoms

Das mitochondriale Genom wird vermutlich ausschließlich maternal vererbt, obwohl von Ausnahmen berichtet wurde [24, 25]. Der maternale Vererbungsmodus scheint aber gesichert zu sein [26, 27]. Alternativ wird der maternale Vererbungsmodus auch als zytoplasmatischer Vererbungsmodus bezeichnet. Für die Ursache der rein maternalen Vererbung gibt es eine Reihe von Theorien: Die Mitochondrien, und die darin enthaltene mtDNA, sind im Zytoplasma der Eizelle und im Zytoplasma der Spermienzelle lokalisiert. Die Spermienzellen der meisten Tierarten enthalten höchstens einige hundert, die Eizellen aber bis zu hun-

dertausend Mitochondrien [28]. Selbst wenn also einige Mitochondrien während der Befruchtung aus der Spermienzelle in die Zygote gelangen, setzt sich dort die mitochondriale Erbinformation der Mutter aufgrund der höheren Anzahl Mitochondrien durch. Es gibt aber wohl noch weitere Mechanismen, die eine Weitergabe paternaler Mitochondrien verhindern sollen. So sind die Mitochondrien der Spermienzelle im Hals lokalisiert, bei der Befruchtung verschmilzt meist nur der Kopf des Spermiums, die Mitochondrien gelangen nicht in die Eizelle. Außerdem setzt nach Befruchtung eine Ubiquitinierung, als erster Schritt des proteolytischen Abbaus, ein, die Mitochondrien der Spermienzelle werden zerstört [29]. Maternale Vererbung bedeutet evolutionär betrachtet für die mtDNA keine Veränderung durch Rekombination, wie in der nDNA, sondern nur durch Mutation. Diese Überlegung hat große Bedeutung für z.B. Anthropologen zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums.

1.2.4 Replikation der mtDNA

Mit einer maximalen Lebensdauer von einigen Wochen teilen sich Mitochondrien unabhängig vom Zellzyklus. Im Gegensatz zur nDNA, die sich einmal im Zellzyklus repliziert, wird die mtDNA kontinuierlich und semi-autonom von der nDNA repliziert, was auch als „relaxed replication“ bezeichnet wird [30, 31]. Auch in post-mitotischen Geweben wie Skelettmuskel oder Gehirn wird die mtDNA laufend erneuert [32]. Ausgeführt wird die Replikation durch die nukleär kodierte Polymerase γ (Poly). Die Poly ist die einzige DNA Polymerase der Mitochondrien, aufgebaut aus zwei Untereinheiten und neben der Polymerase auch als intrinsisches Reperaturenzym aktiv. Als 3'-5' Exonuklease übernimmt sie das Korrekturlesen der neu gebildeten mtDNA [33]. Die Replikation der mtDNA ist momentan Gegenstand einer intensiven Debatte, ein genaues Verständnis der Vorgänge noch nicht vollständig vorhanden [34, 35]. Viele Jahre wurde angenommen, dass die Poly von zwei verschiedenen Startpunkten ausgehend repliziert, von O_H auf dem H-Strang im Urzeigersinn bis zur Fertigstellung von etwa zwei Drittel des Genoms, dann von O_L ausgehend auf dem L-Strang in die Gegenrichtung [36]. Weil die DNA so während der Replikation vorübergehend als Einzelstrang vorliegen würde, wäre sie empfindlicher für mutagene Einflüsse, eine mögliche Erklärung der Häufung von Mutationen im Bereich des großen Bogens. Neuere Untersuchungen legen ein anderes Modell nahe: Ausgehend von multiplen Startpunkten innerhalb einer breiten Initiationszone, soll die mtDNA bidirektional repliziert werden [37]. Dies wird im Gegensatz zur vorherigen asynchronen Replikation

synchrone Replikation genannt. Die Replikation würde nach dem, vom nukleären Genom bekannten, Leitstrang-Folgestrang Modell verlaufen.

1.3 Mutationen der mtDNA

Man schätzt die Mutationsrate der mtDNA ca. zehnmal so hoch wie die der nDNA [38]. Generell wird dieser Unterschied durch eine Reihe von Besonderheiten der mtDNA erklärt: Die mtDNA steht räumlich in engem Kontakt zu den Reaktionen der Atmungskette, bei denen auch reaktive Sauerstoffmoleküle („reactive oxygen species“, ROS) gebildet werden, die Biomoleküle jeder Art schädigen, insbesondere DNA. Weiterhin fehlt der mtDNA der Schutz durch Histone. Und schließlich sollen weniger effektive Reparaturmechanismen für beschädigte mtDNA vorhanden sein [39].

Die Mutationen der mtDNA, am häufigsten Punktmutationen und Deletionen, zeigen einige Eigenarten. Da in einer Zelle die mtDNA in vielen Kopien vorliegt, sind meist nicht alle Moleküle mutiert. Das Nebeneinander von Wildtyp(wt)-mtDNA und mutierter mtDNA nennt man Heteroplasmie. Der Anteil mutierter DNA variiert zwischen verschiedenen Organen und sogar zwischen den Zellen eines Organs [40]. Dieser Anteil hat Einfluss auf die Auswirkungen einer Mutation auf die Funktion einer Zelle [41, 42]. Wenn eine bestimmte Grenze des Anteils mutierter DNA überschritten ist, kommt es zu Funktionsausfällen der Atmungskette und anderen Störungen, was als „threshold effect“ bezeichnet wird. Die Höhe der Grenze ist unterschiedlich, abhängig von der Art der Mutation und der Lage im mitochondrialen Genom. Man findet z.B. 90% bei manchen tRNA Mutationen oder um die 60% bei Deletionen [16]. Menschen mit heteroplasmischen Mutationen zeigen oft sehr unterschiedliche Anteile mutierter mtDNA in verschiedenen Organen oder sogar in verschiedenen einzelnen Zellen.

1.3.1 Mitochondriale Erkrankungen

Der erste Zusammenhang zwischen einer mitochondrialen Funktionsstörung und einem klinischen Phänotyp wurde 1962 hergestellt [43]. Seitdem wurde eine Vielzahl verschiedener Defekte beschrieben. Die mitochondrialen Erkrankungen stellen sowohl klinisch als auch genetisch eine sehr heterogene Gruppe dar. Gemeinsam ist allen mitochondrialen Erkrankungen die Störung der Funktion der Atmungskette. Ursächlich können sowohl Mutationen der mtDNA als auch

Mutationen der nDNA sein. So sieht man mitochondriale Erkrankungen, die X-chromosomal oder autosomal nach den Mendel'schen Gesetzen vererbt werden, neben maternal vererbten Mutationen der mtDNA. Die Mutationen treten häufig auch spontan auf. Mutationen nukleärer Gene der Atmungskette stellen noch die Minderheit diagnostizierter Mitochondriopathien dar, es werden aber zunehmend mehr Gen-Defekte identifiziert (z.B. [44]). Mehr als 150 bisher bekannte Mutationen der mtDNA haben medizinische Bedeutung, darunter einen steigenden Anteil Punktmutationen. Über die Hälfte findet man in den tRNA-Genen (die insgesamt nur etwa zehn Prozent des mitochondrialen Genoms ausmachen) [45]. Beispiele für diese Gruppe mit Punktmutationen von tRNA-Genen sind Erkrankungen wie MERRF (Myoclonic Epilepsy mit ragged red fibers), bei der das tRNA_{LYS}-Gen betroffen ist, oder MELAS (Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Lactatazidose und Schlaganfall-ähnlichen Episoden), hier ist das tRNA_{LEU}-Gen betroffen. Ein Beispiel für einen anderen Gen-Locus ist eine Form des Leigh-Syndroms (mit psychomotorischen Entwicklungsstörungen, Ataxien und muskulärer Hypotonie), bei dem das Gen der ATPase6 betroffen ist, einem Teil des terminalen Komplexes der Atmungskette. Insgesamt sind aber fast alle Mitochondriopathien durch verschiedene Gen-Loci oder Mutationsarten verursachbar.

Krankheitsrelevante Längenmutationen der mtDNA (Deletion, Duplikation, Insertion) treten meist sporadisch auf, sind immer heteroplasmisch und können weite Abschnitte des mitochondrialen Genoms betreffen [46]. Die am häufigsten auftretenden Längenmutationen, die Deletionen der mtDNA, sollen für etwa 30% aller Mitochondriopathien verantwortlich sein. Es gibt sporadisch auftretende Deletionen der mtDNA und multiple Deletionen der mtDNA, die meist sekundär nach einer Mutation eines nukleären Gens auftreten (z.B. Mutation des Poly-Gens) [47]. Die bekannteste Deletion, die 4977bp lange „common deletion“, betrifft etwa ein Drittel des gesamten mitochondrialen Genoms. Das führt zum Verlust von Genen, die für die Untereinheiten der Komplexe I, IV und V sowie für fünf tRNAs kodieren [48] und kann phänotypisch zu verschiedenen Krankheitsbildern führen, z.B. zu CPEO (chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie) oder zum verwandten Kearns-Sayre-Syndrom (KSS), einer systemischen Verlaufsform mit CPEO und zusätzlichen Symptomen wie Retinitis pigmentosa und Kardiomyopathie mit Reizleitungsblock. Auch das Pearson Syndrom kann durch die „common deletion“ verursacht sein, mit sideroachrestischer Anämie, Panmyeloptose und exokriner Pankreasinsuffizienz [49]. Darüberhinaus werden eine Vielzahl verschiedener Deletionen beschrieben, wobei eine exakte Zuordnung von Phänotyp oder klinischem Zustandsbild zu zugrundeliegender Deletion häufig noch nicht

erfolgt ist. Auch überschneiden sich häufig die einzelnen Krankheitsbilder oder einem Krankheitsbild können mehrere verschiedene Deletionen zugeordnet werden.

Trotz der Vielzahl ursächlicher Mutationen ist die klinische Manifestation der Mitochondriopathien oft sehr ähnlich. Im Allgemeinen sind Gewebe und Organe, die stark von der Atmungskette abhängig sind, am schwersten betroffen. So sind Neurologische Syndrome häufig, ebenso Myopathien, aber auch kardiale, ophthalmologische und endokrine Systeme sind mitbeteiligt [50]. Die Mutationen der mitochondrialen Erkrankungen können alle Kopien (Homoplasie) oder nur einen Teil der Kopien (Heteroplasmie) der mtDNA betreffen. Die Klinik der mitochondrialen Gen-Defekte wird durch den Grad der Heteroplasmie beeinflusst.

Die meisten krankheitsverursachenden Mitochondriopathien treten sporadisch auf, ein kleiner Teil hereditär. Die Keimbahnmutationen der mtDNA werden in maternaler Erblinie übertragen. Wichtig für die Vererbung mitochondrialer Erkrankungen, die auf so einer Mutation beruhen, ist ein als „genetic bottleneck“ bezeichneter Vorgang. Dieser soll die klinische Variabilität mitochondrialer Erkrankungen bei Zwillingen erklären. Die Eizelle besitzt eine hohe Zahl an Mitochondrien. Bei Heteroplasmie ist ein Teil der mtDNA Moleküle mutiert. In der frühen Oogenese wird die Zahl der mtDNA Moleküle stark reduziert, durch diesen Vorgang wird also eine Art Stichprobe des mitochondrialen Genoms ausgewählt. Je nach Grad der Heteroplasmie der Eizelle und durch Zufall wird der Grad der Heteroplasmie des Embryos festgelegt [51, 52]. Ähnlich bei sporadischen Mutationen. Während der Mitosen der frühen Oogenese oder Embryogenese kann ein einzelnes mtDNA-Molekül mutieren. Abhängig von Zeitpunkt und der betroffenen Zelle führt so ein Ereignis zu Verteilung eines unterschiedlichen Heteroplasmie-Grads über den Körper, und sukzessiv zu Funktionseinschränkungen des betroffenen Organs oder Gewebes, wobei die Mutation Mosaik-artig im Körper verteilt ist, je nachdem, welche Zellen in den frühen Entwicklungsphasen betroffen sind.

Fest steht auch, dass die Anteile mitochondrialer Mutationen sich im Lauf des Lebens verändern. Eine Erklärung für den späten Beginn mancher mitochondrialen Erkrankungen könnte das Modell der „relaxed replication“ liefern [53]. Es erklärt Veränderungen des Anteils mutierter mtDNA in post-mitotischem Gewebe durch Unterschiede in der Replikation mutierter mtDNA im Vergleich zur Replikation der wt-mtDNA. MtDNA mit Deletionen könnte z.B. einen Replikationsvorteil gegenüber der wt-mtDNA haben und in einer Zelle akkumulieren.

Ein anderer Vorgang, der als „mitotic segregation“ bezeichnet wird, könnte die

Veränderung in mitotischem Gewebe erklären. Die Heteroplasmie der Zelle wird in unterschiedlichem Anteil an die Tochterzellen weitergegeben [31, 54]. Es entstehen Zell-Linien mit hohen Anteilen mutierter mtDNA und andere mit niedrigen Anteilen mutierter mtDNA.

Mutationen der mtDNA scheinen aber noch über die Gruppe der mitochondrialen Erkrankungen hinaus pathophysiologisch relevant zu sein. Zum einen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson, zum anderen, und ebenfalls mit Degeneration assoziiert, beim Alterungsprozess. Hier könnten v.a. somatische Mutationen von Bedeutung sein [55].

1.3.2 Somatische Mutationen

Als Somatische Mutationen bezeichnet man, in Abgrenzung zu Mutationen der Keimbahn, Mutationen die im Organismus im Laufe des Lebens entstehen und deren Folgen ihn selbst betreffen können. Sie werden nicht weitergegeben, sondern vergehen mit dem Tod des Individuums. Die Akkumulation solcher Mutationen sollen am Alterungsprozess und an degenerativen Erkrankungen beteiligt sein [55]. Untersuchungen an verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers zeigten meist eher wenige altersabhängige Punktmutationen und Deletionen der mtDNA. Möglicherweise sind die Mutationen Mosaik-artig intra- oder interzellulär verteilt, so dass Messungen auf Ebene der einzelnen Zelle eher Erfolg versprechen als Untersuchungen von Gewebe-Homogenaten [56].

Punktmutationen der mtDNA:

Es gibt bisher eher wenig Berichte über die Akkumulation von Punktmutationen im Laufe des Lebens. Dies ist überraschend, da eine Vielzahl von Punktmutationen für mitochondriale Erkrankungen verantwortlich sind. Möglicherweise sind die Methoden zur Detektion noch nicht ausgereift [56]. Eine große Rolle für eine Akkumulation spielt möglicherweise auch die Lage der Punktmutationen im Genom. Untersuchungen an menschlichen Fibroblasten und Skelettmuskelzellen zeigten die altersabhängige Akkumulation von Punktmutationen in einer Kontrollregion der Transkription, ohne allerdings funktionelle Auswirkungen nachweisen zu können [57, 58].

Punktmutationen der mtDNA sind bekannte Ursachen mitochondrialer Krankheiten (s.o.) und sind manchmal mit anderen Krankheiten wie Diabetes mellitus und Morbus Parkinson assoziiert [59, 60]. Insbesondere aber beim Alterungsprozess gibt es relativ wenig festgestellte Zusammenhänge. Es wurde für bestimmte

Punktmutationen eine Akkumulation in Muskelgewebe älterer Menschen festgestellt, allerdings mit sehr niedrigen Heteroplasmiegraden [61]. In COX-defizienten Zellen älterer Personen wurden hohe Anteile der mtDNA mit bestimmten Punktmutationen gefunden, in den normalen Zellen dieser Personen dagegen nicht [62]. Man könnte also annehmen, dass in einzelnen Zellen hohe Level an altersassoziierten Punktmutationen zu Funktionsausfällen führen, im Gewebe insgesamt aber nur verhältnismäßig wenige Mutationen zu messen sind [63]. Es wird ein Schwellenwert von durchschnittlich etwa 85% mutierter mtDNA für funktionelle Auswirkungen angenommen [64], abhängig wohl auch von der Lage der Punktmutation im Genom. Die Rolle der Punktmutationen bei Alterung ist aufgrund neuerer Ergebnisse bei transgenen Mäusen besonders umstritten [65].

Deletionen der mtDNA:

Einige Studien berichten über eine Häufung von Deletionen der mtDNA in alterndem post-mitotischen Geweben und bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen [z.B. 66, 67]. Von den altersabhängigen multiplen Deletionen sind vor allem post-mitotische Gewebe mit hohem Energie-Bedarf betroffen, wie Herzmuskel, Skelettmuskel und Hirngewebe [68, 69, 70].

Zur Entstehung der Deletionen gibt es unterschiedliche Modelle. Die Deletionen sind meist von Wiederholungssequenzen (sog. „direct repeats“) flankiert. Diese Wiederholungssequenzen stehen im Zentrum des ersten Modells. Man nimmt an, dass Basenpaare verrutschen können, wenn mehrere komplementäre Basen hintereinander liegen. Liegt dann noch dieser Abschnitt als Einzelstrang vor, kann sich eine extrahelikale Schleife des L-Strangs bilden. Die extrahelikale Schleife geht verloren, es wird die verkürzte mtDNA repliziert. Diese Annahme deckt sich mit der Beobachtung, dass die meisten Deletionen im Bereich des großen Bogens zu finden sind. Wenn man das Modell der asynchronen Replikation voraussetzt liegt hier der L-Strang besonders häufig und lange als Einzelstrang vor da zuerst der H-Strang repliziert wird [35]. Es gibt eine Reihe von Einwänden gegen diese Vorstellung. Die asynchrone Vorstellung der Replikation wird wie oben beschrieben zunehmend kritisch gesehen. Trifft diese nicht zu, muss man zumindest die Häufung der Deletionen am großen Bogen anders erklären. Eine Möglichkeit wäre, die Häufung durch eine ungleiche Verteilung der Wiederholungssequenzen zu erklären. Tatsächlich liegen die relevanten Sequenzen häufiger im großen Bogen, so dass man die höhere Zahl der Möglichkeiten als Erklärung heranziehen könnte [35]. Ein anderer Kritikpunkt ist, dass mit einer höheren Replikationsfrequenz auch eine höhere Deletionslast in Geweben mit häufigen

Zellteilungen zu sehen sein müsste, was aber nicht der Fall ist [71]. So kann man annehmen, dass andere Mechanismen an der Entstehung der Deletionen beteiligt sind, wie die Reparatur beschädigter DNA-Abschnitte. Doppelstrangbrüche in der mtDNA führen zum Einsetzen der 3'-5' Exonuklease. Dabei liegen Abschnitte mit Wiederholungssequenzen frei. Es kommt zu Fehlpaarungen und Bildung einer Schleife, die anschließend zugrunde geht, das verkürzte mtDNA Molekül bleibt bestehen[35].

Auswirkungen von Mutationen der mtDNA:

Wie kann die mutagene Schädigung der mtDNA so große Auswirkungen auf die Funktion der Zelle haben, obwohl die mtDNA nur 1-3% des genetische Materials einer tierischen Zelle darstellt [39, 72]? Man kann das durch die Besonderheiten der mtDNA erklären. Die genetische Information der mtDNA ist äußerst kompakt, die mtDNA enthält keine Introns und kodiert für Bausteine entscheidender Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels. Eine Störung hier kann also schwere Auswirkungen auf die Funktion und Integrität der ganzen Zelle haben. So gibt es beispielsweise den mitochondrialen Weg der Apoptose-Aktivierung. Eine Schädigung der mtDNA könnte den Zelltod auslösen [73].

Weiterhin sind Reparaturmechanismen der mtDNA weniger effektiv. Dies könnte zur Akkumulation hoher Anteile mutierter mtDNA führen [39]. Auch können durch die Mutationen der mtDNA nukleäre Gene gestört werden. Die Möglichkeiten der Pathophysiologie sind also vielfältig, ein eindeutiger Nachweis relevanter Auswirkungen von mtDNA Mutationen beim alternden Menschen ist aber noch nicht erfolgt. Gerade die zentrale Rolle der Mitochondrien im Stoffwechsel und die räumliche Nähe zu oxidativem Stress führten zur Entwicklung einer Theorie des Alterungsprozesses mit diesen Zelleorganellen im Mittelpunkt.

1.4 Die mitochondriale Theorie des Alterns

1.4.1 Der Alterungsprozess

„Altern“ kann man als fortschreitende generalisierte Funktionsminderung bezeichnen, die die Verletzlichkeit gegenüber Umweltfaktoren erhöht und mit steigendem Risiko für Krankheit und Tod einhergeht [74]. Die Funktionsminderung findet auf allen Ebenen der Funktion statt, beispielsweise einer Verschlechterung des Gangbilds, dem wiederum eine Funktionsminderung von vestibulären, cere-

bellären, muskulären und propriozeptiven Systemen zu Grunde liegt. Und die Verschlechterung der Systeme als Ganzes wird von der Degeneration der jeweiligen Zellen verursacht. Die allgemeine Grundlage nahezu aller Theorien zum Alterungsprozess ist der Funktionsverlust von Systemen der Zellfunktion durch die Akkumulation von Schäden an irgendeinem Teil der Zelle.

1.4.2 Entwicklung der Theorie

Es gibt eine Vielzahl an Theorien, die den zunehmenden zellulären Funktionsverlust im Laufe des Alterungsprozesses erklären wollen, beispielsweise durch Ungenauigkeiten in der Protein-Translation [75], durch einen Zusammenbruch der DNA-Reparatursysteme [76] oder durch die Induktion von Telomer-Verkürzungen [77]. Auch wenn die Mechanismen des Alterns vermutlich multifaktoriell und viel komplexer sind, als wir das heute überschauen können, soll hier auf eine Theorie näher eingegangen werden, die mitochondriale Theorie des Alterns.

Denham Harman entwickelte 1956 die Theorie, dass der physiologische altersabhängige Funktionsverlust durch eine zunehmende Akkumulation von oxidativen Schäden entsteht und dass dieses die maximal erreichbare Lebenszeit eines Individuums beschränkt [74]. Die oxidativen Schäden sollen dabei durch freie Radikale verursacht werden. Der Ausdruck „freie Radikale“ bezeichnet alle Atome oder Moleküle mit einem unpaaren Elektron auf der äußersten Bahn, was mit hoher wahlloser Reaktivität einhergeht, die zu molekularen Schäden führen kann. Nach der Entdeckung des mitochondrialen Genoms modifizierte Harman seine Theorie, indem er die Rolle der Mitochondrien bei oxidativen Stress miteinarbeitete und entwarf die mitochondriale Theorie des Alterns [78]. In den darauf folgenden Jahrzehnten wurde diese Theorie weiter verändert. Vor allem in den 1990er Jahren setzte eine Flut von Veröffentlichungen zu diesem Thema ein. Die Rolle von somatischen Mutationen der mtDNA trat in den Vordergrund [79].

Die erweiterte Theorie lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: In der Atmungskette entstehen reaktive Sauerstoffspezies (auch „reactive oxygen species, ROS, genannt), diese schädigen Makromoleküle, insbesondere die mtDNA. Daraufhin führt die Akkumulation der mtDNA Schäden zu Defekten der Atmungskette, dadurch zu höherer ROS Produktion und vermehrten oxidativen Stress. Das ist der so genannte Teufelskreis („vicious cycle“) der ROS Produktion (Abb. 1.3). Dieser Teufelskreis soll für die Begrenzung der Lebenszeit von Säugetieren verantwortlich sein.

1.4.3 Oxidativer Stress

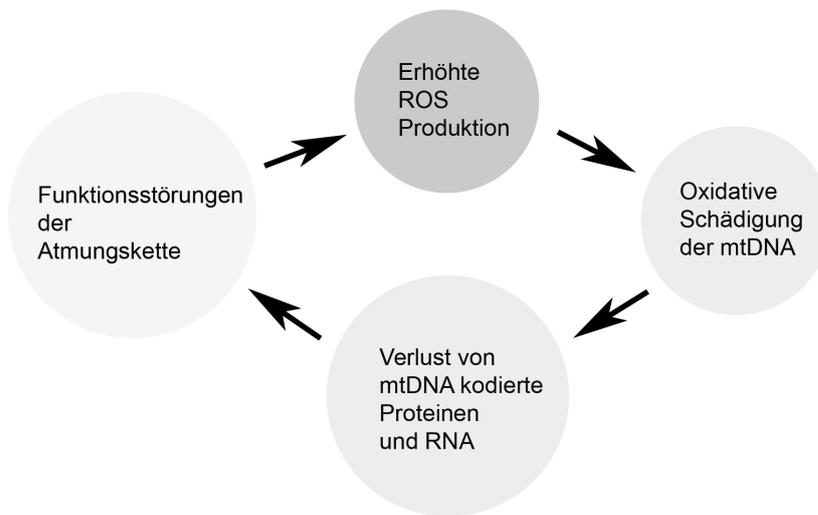


Abbildung 1.3: Eine schematische Darstellung des „Teufelskreis“ („vicious cycle“) aus ROS-Produktion und oxidativen Schäden.

Die Bezeichnung ROS wird normalerweise für jedes sauerstoffhaltige Molekül (ob Radikal oder nicht-Radikal) verwendet, das dazu fähig ist, irgendeine schädliche Reaktion anzustoßen. ROS sind z.B. Superoxid-Radikale ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (HO^{\cdot}), Peroxyl-Radikale ($R-O_2^{\cdot}$), Alkoxy-Radikale ($R-O^{\cdot}$), Hydroperoxyl-Radikale (HO_2^{\cdot}), hypochlorige Säure ($HOCl$) und singuleter Sauerstoff (1O_2). Die meisten Arbeiten konzentrieren sich auf die Superoxid-Radikale, Wasserstoffperoxid und die Hydroxylradikale. ROS können physikalisch durch UV-Licht oder γ -Strahlung induziert werden, aber auch durch Autoxidation in der Atmungskette. Der elektrochemische Gradient über die innere Mitochondrienmembran wird durch die Enzyme der Atmungskette geschaffen, die ständig Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum pumpen. Die Energie für die Protonenpumpe entsteht durch die Weitergabe der Elektronen entlang des Energiepotentials der Atmungskette. An bestimmten Stellen der Kette werden die Elektronen an Transporter weitergegeben, die nur ein Elektron aufnehmen. Besonders Komplex I und Komplex III der Atmungskette sind für die Entstehung von ROS verantwortlich. Die Elektronen reagieren dann, statt die Atmungskette entlang bis zu Komplex IV zu wandern, zufällig mit molekularem Sauerstoff, die Ein-Elektronenreduktion, und ein Superoxid-Radikal entstehen. Die Dismutation von zwei Superoxid-Molekülen ergibt das weniger aggressive Wasserstoffperoxid (und O_2). H_2O_2 kann jedoch in Gegenwart von Fe^{2+} und anderen Übergangsmetallionen durch Übertragung eines dritten Elektrons in ein Hydroxyl-Ion und das äußerst reaktive Hydroxylradikal (HO^{\cdot}) gespalten werden (sog. Fenton Reaktion). Man schätzt, dass weniger als 0,2 % des aufgenomme-

nen Sauerstoffs in ROS umgewandelt werden [80]. ROS schädigen Biomoleküle aller Art. Lipide, speziell ungesättigte Fettsäuren, werden durch Lipidperoxidation geschädigt. In Proteinen sind bestimmter Seitengruppen besonders empfindlich gegenüber ROS. Die Reaktionen können direkt Reste im aktiven Zentrum modifizieren oder über Veränderungen der Raumstruktur der betroffenen Proteine erhebliche Auswirkungen auf die biologische Aktivität haben (z.B. Meth358 bei α -1-Antitrypsin). In der DNA induzieren ROS durch Modifikationen der Desoxyribosen Strangbrüche. Außerdem kommt es zur Zerstörung bzw. Veränderung der verschiedenen Basen und damit zu Fehlpaarungen und Mutationen. Besonders häufig ist die Bildung von Thymin Dimeren und die Entstehung von 8-Hydroxyguanosin [81].

Um die schädlichen Wirkungen der ROS entgegenzuwirken haben alle aerob lebenden Organismen bestimmte Kontroll-Strategien entwickelt. Dabei teilen sich enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen diese Aufgabe. Nicht-enzymatisch werden ROS durch verschiedenen Antioxidantien abgefangen, Radikalfänger wie das wasserlösliche Ascorbat (Vitamin C) und das lipidlösliche α -Tocopherol (Vitamin E). Den enzymatischen Teil übernehmen Enzyme wie die Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathionperoxidase, die ROS in weniger reaktive Produkte umwandeln. Besonders die Entdeckung der Superoxid-Dismutase (SOD), die die Reaktion von zwei Superoxid-Radikalen zu Wasserstoffperoxid katalysiert, hatte für die Einordnung der ROS große Bedeutung [82]. In Säugetieren gibt es drei verschiedene Typen von SODs, die sich sowohl durch ihre Lokalisation als auch in ihrem aktiven Zentrum unterscheiden. Die dimere CuZn-SOD (SOD1) wird fast ausschließlich im Zytoplasma gefunden, die tetramere Mn-SOD (SOD2) befindet sich in den Mitochondrien und die tetramere CuZn-SOD (SOD3) wird in den extrazellulären Raum abgegeben. Die Bedeutung der SOD wurde etwas aktueller noch unterstrichen, als gezeigt wurde, dass Mäuse, denen die mitochondriale Form der SOD (MnSOD oder SOD2) fehlt, schwere Erkrankungen und eine verkürzte Lebenserwartung zeigten [83, 84]. Eine andere Gruppe untersuchte Mäuse, die in Mitochondrien das Enzym Katalase über-exprimieren, und fanden eine verlängerte Lebenszeit [85]. So wird die Entstehung von ROS effektiv verhindert. Gerät das Gleichgewicht aus oxidativen Stress und Antioxidativen Systemen aber aus dem Lot, insbesondere wenn die Funktion der Atmungskette irgendwie schon geschädigt ist [86], entstehen oxidative Schäden an der mtDNA, d.h. vor allem Modifikationen an Pyrimidin- und Purin-Basen, Einzel- und Doppelstrangbrüche. Die DNA Reparatur-Systeme der mtDNA sind im Vergleich zur nDNA noch wenig untersucht. Bisherige Arbeiten zeigten, dass bei

der mtDNA die Nukleotid-Exzisions Reparatur (einer der sechs Haupt-Reparatur-Signalwege der nDNA) fehlt und andere Reparatur-Signalwege andere Proteine beinhalten [87]. Die vorhandenen mitochondrialen DNA-Reparatursysteme sind wohl weniger leistungsfähig als die nukleäre DNA-Reparatursysteme [39].

1.4.4 COX-Defizienz und Mutationen der mtDNA

Funktionsstörungen der Atmungsketten sind ein zentraler Schritt im „vicious cycle“ der mitochondrialen Theorie des Alterns. Vor allem histochemisch detektierbare Ausfälle des Komplex IV der Atmungskette (COX) haben sich als Marker für Mutationen der mtDNA etabliert. Die drei größten Untereinheiten des komplex aufgebauten Enzyms sind mtDNA kodiert, bei Mutationen der mtDNA ist dieser Atmungsketten Komplex häufig vermindert oder nicht aktiv. Dieser Zusammenhang wurde zuerst bei Mitochondriopathien wie der CPEO und dem KSS hergestellt [88, 89, 90], denen Deletionen der mtDNA zugrunde liegen. Der Verlust oder die Reduktion der Enzymaktivität der COX zeigte sich als konstant nachweisbare Pathologie bei Muskelbiopsien betroffener Patienten. Eine Zelle mit verminderter oder keiner COX-Aktivität wird als COX-defizient bezeichnet. Solche Zellen wurden auch in Geweben älterer Personen ohne eine Mitochondriopathie gefunden [91]. Es liegt also nahe, COX-Defizienz im Alterungsprozess weiter zu untersuchen und eine Verbindung zu Deletionen der mtDNA herzustellen.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, Zusammenhänge zwischen Deletionen der mtDNA und Störungen des Energiestoffwechsels im Alterungsprozess darzustellen. Dabei wurden die Untersuchungen mit modernen quantitativen Einzelzellmethoden durchgeführt. Es wurde post-mortem entnommenes Gewebe von Personen im Alter von wenigen Monaten bis über 90 Jahre analysiert. Folgende Hypothesen wurden überprüft:

- i. Die Häufigkeit COX-defizienter Zellen nimmt mit dem Lebensalter zu.
- ii. COX-defiziente Zellen tragen mehr Deletionen der mtDNA als COX-normale Zellen.
- iii. Deletionen der mtDNA akkumulieren durch klonale Expansion.
- iv. Der Anteil an mtDNA mit Deletionen nimmt mit dem Lebensalter zu.
- v. Es gibt eine reaktive Steigerung der mitochondrialen Proliferation bei COX-Defizienz und mit zunehmendem Lebensalter.
- vi. Es bestehen Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben: Skelettmuskel, Herzmuskel, Augenmuskel und Gehirn.

Für die Hypothese (i) wurde orientierend der Anteil COX-defizienter Zellen in den Gewebeschnitten unterschiedlich alter Muskulatur bestimmt. Für die Hypothese (ii) wurden einzelne Zellen, sowohl COX-defiziente als auch COX-normale, isoliert und anschließend der Anteil von mtDNA Molekülen mit Deletionen bestimmt. Um mehr über die Art, Zahl und Herkunft der Deletionen zu erfahren (Hypothese (iii)), wurden die gleichen Proben mit der Long Range nested PCR analysiert. In diesem Ansatz wurden Myozyten der äußeren Augenmuskulatur bearbeitet. Für Hypothese (iv) wurden in mehreren Geweben von Personen unterschiedlichen Alters der Anteil der mtDNA Moleküle mit Deletionen bestimmt. Das Ausmaß mitochondrialer Proliferation (Hypothese (v)) wurde durch Bestimmung der Kopienzahl der mtDNA bewertet. Zur Überprüfung der Hypothese (vi) wurden jeweils Skelett-, äußere Augen- und Herzmuskulatur sowie Klein- und Großhirnrinde untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Gewebeproben und histologische Präparation

Gewebeproben:

Es wurden Gewebeproben von 53 Individuen untersucht. Von diesen Individuen wurden 28 Gewebeproben des M. iliopsoas, 25 Herzmuskelproben, 24 Proben des Cortex cerebri, 20 Proben des Cortex cerebellaris (nachfolgend verkürzt als „Cortex“ und „Cerebellum“ bezeichnet) und 22 Augenmuskelproben entnommen. Es konnte von keinem Individuum alle betrachteten Gewebe untersucht werden. Die untersuchten Augenmuskelproben stammen von anderen Individuen als die Proben der anderen vier Gewebe. Von 51% der Individuen wurde nur ein Gewebe untersucht, von 4% wurden zwei Gewebe und von 21% drei Gewebe untersucht. Vier Gewebe des gleichen Leichnams konnten bei 25% aller Individuen untersucht werden (alle prozentualen Angaben gerundet). 10 bis 30 mg Gewebe wurden aus den an akuten und subakuten Ursachen verstorbenen Leichnamen im Alter von 3 Monaten bis zu 99 Jahren von der Rechtsmedizin der Universität Kiel entnommen und uns vollständig anonymisiert zur Verfügung gestellt. Zwischen Tod und Gewebeentnahme durften höchstens 48 Stunden vergehen. Das Gewebe wurde nach Entnahme rasch bei -70 bis -80° C eingefroren. Die 22 Proben der Augenmuskulatur wurden uns vom Pathologischen Institut München vollständig anonymisiert überlassen. Die Gewebesammlung erfolgte mit Genehmigung der zuständigen Ethikkommissionen unter Einhaltung der aktuellen Fassung der Deklaration von Helsinki.

Tabelle 3.1: Charakterisierung der untersuchten Gruppen

Gewebe	Altersbereich	Altersmittel	Standardabweichung (=SD)
M. iliopsoas	0,2 - 90 a	53 a	22 a
Myokard	0,2 - 91 a	52 a	23 a
Cortex	0,2 - 88 a	52 a	20 a
Cerebellum	0,2 - 91 a	52 a	23 a
Augenmuskel	11 - 90 a	50 a	29 a
Alle	0,2 - 91 a	53 a	25 a

Histologische Präparation:

Erstellung der histologischen Präparate:

Es wurden von jeder Gewebeprobe 10 μ m dicke Schnitte mit dem Kryostat an-

gefertigt. Vor dem Schneiden im Kryostat wurden die Proben von -80°C in -20°C umgelagert und dort für mindestens 24h gelagert, um die Qualität der Schnitte zu verbessern. Ein Teil der Schnitte wurden auf Superfrost Objektträger gezogen, der andere Teil auf Membran-Objektträger für die spätere Lasermikrodissektion. Die aufgezogenen Objektträger wurden für ca. eine Stunde luftgetrocknet und dann bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien und Geräte der histologischen Präparation.

Verbrauchsmaterial/Gerät	Produktnummer	Hersteller
Leica MembranSlides® PEN-membran 2,0µm	11505158	Micro Dissect GmbH (Herborn)
Objektträger Superfrost	7201277	Menzel GmbH + Co KG
Deckgläser	190002450	IDL (Nidderau)
Kryostat 2800 Frigocut E	-	Reichert-Jung
O.C.T. Kryoeinbettmedium	4583	Tissue-Tek

3.2 Färbungen

3.2.1 COX-SDH-Färbung

Grundlagen der COX-SDH Färbung:

Die sequenzielle histochemische COX/SDH-Färbung ermöglicht die Identifikation COX-negativer Zellen. Diese Zellen zeigen keine oder wenig COX-Aktivität. Man färbt dabei in einem ersten Schritt COX-positive Zellen (das heißt Zellen, die COX-Aktivität zeigen) braun an [92], COX-negative Zellen hingegen können das zugegebene Cytochrom C nicht oxidieren und bleiben farblos. Um die Darstellung zu verbessern, folgt darauf die SDH-Färbung. Hier stellen sich alle Zellen dunkelblau dar, welche zuvor Cytochrom C nicht umsetzen konnten, aber eine ausreichende SDH-Enzymaktivität besitzen. COX-positive Zellen sind durch die vorangegangene Färbung für die SDH-Färbung blockiert und stellen sich weiterhin braun dar. Die COX (Komplex IV) ist zum Teil mitochondrial kodiert und sehr empfindlich für Schäden der mtDNA. Die SDH (Komplex II) ist dagegen rein nukleär kodiert und nicht von mtDNA-Mutationen betroffen. Die COX-SDH-Färbung zeigt also eine funktionelle Beeinträchtigung der Funktion der Atmungskette, genauer des mitochondrial kodierten Anteils der Atmungskette. Dies erlaubt Rückschlüsse auf den Zustand des mitochondrialen Genoms.

Tabelle 3.3: Chemikalien der COX-SDH-Färbung.

Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
Diaminobenzidin (DAB)	D-5637	Sigma
Cytochrom C	C-2506 (Pferdeherz)	Sigma
Natrium Succinat	S-2378	Sigma
Nitro Blau Tetrazolium	N-6876	Sigma
Phenazinmethosulfat	P-9625	Sigma
Natriumazid	BDH30111	Sigma
Catalase	C-9322	Sigma
PBS	1770	Sigma-Aldrich

Tabelle 3.4: Protokoll zur Herstellung von Lösungen und Aliquots.

Diaminobenzidin (DAB) Aliquots (800 µl)	
	1. 36 mg 5 mM DAB in 10 ml H ₂ O auflösen
	2. 10 ml 0,2 M Phosphatpuffer dazu geben (pH 7,5)
	3. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
	4. In 1,5 ml Eppendorf-Tubes aliquotieren
	5. Schnellgefrieren in flüssigem Stickstoff
	6. Vor Gebrauch rasch auftauen
Cytochrom C Aliquots (420 µl)	
	1. 62 mg 500 µM Cytochrom C in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) lösen
	2. Vorsichtig schütteln
	3. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
Natrium Succinat Aliquots (250 µl)	
	1. 3,5 g 1,3 M Natrium Succinat in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer lösen
	2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
Nitro Blau Tetrazolium (NBT) Aliquots (800 µl)	
	1. 49 mg 1,875 mM NBT in 32 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) lösen
	2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
Phenazinmethosulfat (PMS) Aliquots (250 µl)	
	1. 6,12 mg 2,0 mM PMS in 10 (?) 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,0) lösen
	2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen
	3. Aliquotierung in einem dunklen Raum und lichtgeschützte Aufbewahrung

Natriumazid Aliquots (100 µl)	
	1. 32,5 mg 100 mM Natriumazid in 5,0 ml, 0,1 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) lösen
	2. pH der Lösung auf 7,0 bei 25°C einstellen

Anmerkung: Sämtliche Aliquots wurden bei -20°C gelagert und bei Bedarf zügig aufgetaut.

Tabelle 3.5: Protokoll der kombinierten COX-SDH Färbung.

Für die Superfrost- Objektträger wurde folgendes Protokoll verwendet:

Fixierung der Präparate	
	5 min in -20°C kaltes Aceton (100%) legen
COX-Färbung	
	1. 200 µl Cytochrom C mit 800 µl DAB mischen
	2. Eine Spatelspitze Catalase hinzufügen
	3. Gut Vortexen
	4. Je 1-2 Tropfen auf das Präparat aufbringen
	5. Bei 37°C für 1 Stunde inkubieren
	6. 2 mal in PBS waschen (kurz eintauchen)
	7. Überstehende Flüssigkeit vorsichtig abtupfen
SDH-Färbung	
	8. 100 µl Natrium Succinat, 100 µl PMS (lichtgeschützt!) und 10 µl Natriumazid zu 800 µl NBT geben
	9. Gut Vortexen
	10. Je 1-2 Tropfen auf das Präparat aufbringen
	11. Bei 37°C für 1 Stunde inkubieren
	12. 2 mal in PBS waschen (kurz eintauchen)
	13. 10 mal in 75% Ethanol tauchen
	14. 10 mal in 95% Ethanol tauchen
	15. 10 mal in 100% Ethanol tauchen
	16. 10 min in 100% Ethanol legen
	17. Kurz trocknen lassen
	18. Deckmedium und Deckglas aufbringen

Bei Membran-Objektträgern wurde ein abweichendes Protokoll verwendet:

Fixierung der Präparate	
	1 min in -20°C kaltes Aceton (100%) tauchen
COX-Färbung	
	Schritte 1-7 wie oben

SDH-Färbung	
	Schritte 8-12 wie oben
	13. 10 mal in 100% Ethanol tauchen
	14. Kurz trocknen lassen
	15. Bei -20°C einfrieren

Anmerkungen: Die zu färbenden Schnitte wurden 30 Minuten vor Färbung bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die gefärbten und fixierten Glas-Objektträger wurden bei Zimmertemperatur gelagert, die gefärbten Membran-Objektträger bei -20°C bis -40°C.

3.2.2 Anti-NeuN Färbung:

Grundlagen:

Die exakte Identifikation von Nervenzellen hat zentrale Bedeutung für die nachfolgenden Untersuchungen, da bei diesen ausschließlich Neuronen untersucht werden sollen. NeuN (für „neuronal nuclei“) ist ein spezifisch in neuronalen Nuclei und neuronalem Zytoplasma vorkommendes Protein. Wegen der Spezifität der Expression dieses Proteins wird es als universaler Marker für post-mitotische neuronale Zellen verwendet, um diese von Glia- und anderen Zellen abzugrenzen. Der monoklonale Antikörper mAb A60 bindet NeuN mit wenigen Ausnahmen (Purkinje-Zellen des Kleinhirns, Neurone des Bulbus olfactorius und Photorezeptoren der Retina). Mit diesem Antikörper und dem entsprechenden immunhistochemischen Färbe-Kit mit Sekundärantikörpern können Nervenzellen von anderen Zellen eines Schnittes des Gehirns differenziert werden [93].

Tabelle 3.6: Chemikalien für die Anti-NeuN Färbung.

Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
Anti-NeuN, clone A60	MAB 377	Chemicon (Millipore)
Anti-Mouse Poly HRP IHC [®] Detection Kit	2766	Chemicon (Millipore)
Normal Goat Serum	S26-100ML	Chemicon
PBST-Puffer		

Anmerkungen: Der Antikörper und das Normal Goat Serum wurde bei -20°C gelagert, der Detection Kit bei +4°C aufbewahrt.

Tabelle 3.7: Protokoll der Anti-NeuN Färbung.

Anti-NeuN Färbung	
	1. Die Präparate in -20°C kaltem Aceton 5-7 Minuten fixieren.
	2. 5-10 Minuten trocknen lassen
	3. In PBST 5 Minuten waschen
	4. Einige Tropfen der ready-to-use Peroxidase Blocking Solution auf jedes Präparat geben, 5 Minuten einwirken lassen
	5. In PBST 5 Minuten waschen
	6. Einige Tropfen 5% Normal-Goat Serum auf die Präparate geben, für 30 Minuten einwirken lassen
	7. Überstehende Flüssigkeit vorsichtig abtupfen (nicht waschen!)
	8. Primärantikörper NeuN 1:100 mit 5% Normal-Goat Serum verdünnen
	9. 2-3 Tropfen pro Präparat auftragen, 90 Minuten einwirken lassen, eine Negativkontrolle mit reinem 5% Normal-Goat Serum behandeln
	10. In PBST 5 Minuten waschen
	11. Vom Sekundärantikörper Anti-Mouse-Poly-HRP einige Tropfen auftragen, 30 Minuten einwirken lassen
	12. In PBST 5 Minuten waschen (frisch!)
	13. DAB Chromogen nach Angaben des Herstellers verdünnen (1 Tropfen DAB Chromogen (~25 µl) mit 1 ml DAB Puffer mischen)
	14. Einige Tropfen des verdünnten DAB Chromogens auf die Präparate geben, die Farbe für etwa 15 Minuten entwickeln lassen
	15. In PBST 5 Minuten waschen
	16. 10mal in 50% Ethanol tauchen
	17. 10mal in 75% Ethanol tauchen
	18. 5 Minuten in 100% Ethanol stehen lassen, Membranobjektträger nur 10mal eintauchen
	19. Membran-Objektträger 30 Minuten trocknen lassen, dann einfrieren, bei Glas-Objektträgern Deckmedium und Deckglas auftragen

Anmerkungen: Die gefärbten und fixierten Glasobjektträger wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, die gefärbten Membranobjektträger bei -20°C bis -40°C

3.3 Lasermikrodissektion

Grundlagen:

Man verwendet bei der hier verwendeten Methode der Lasermikrodissektion, der sog. „Laser Capture Microdissection“, spezielle Membran-beschichtete Objektträger. Diese Objektträger tragen zwischen dem Glas Objektträger und dem Schnitt einen dünnen transparenten Film, der durch einen schwachen Laserstrahl ausgeschnitten werden kann [94]. Durch das Ausschneiden fällt der markierte Bereich anschließend aus dem Gewebeverband in ein bereitgestelltes Reaktionsgefäß mit Pufferlösung (Abb. 3.1). Das System ermöglicht die Dissektion einzelner Zellen.

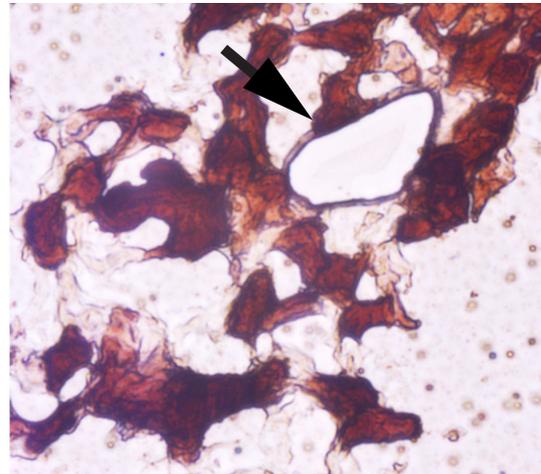
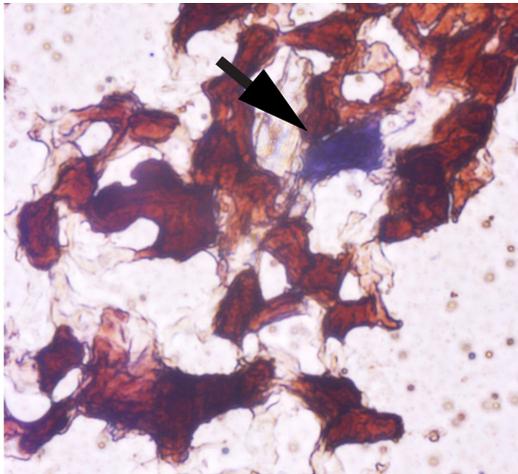


Abbildung 3.1: COX-SDH Färbung eines Augenmuskelschnittes. Die COX-defiziente Zelle (Pfeil) wurde mit Lasermikrodissektion ausgeschnitten und in einem PCR Reaktionsgefäß aufgefangen. In der Abbildung ein Muskelschnitt links oben vor, rechts oben nach Lasermikrodissektion, in der Abbildung links unten eine aufgefangene Zelle im Reaktionsgefäß.

Tabelle 3.8: Verbrauchsmaterialien und Gerät der Lasermikrodissektion.

Verbrauchsmaterial/ Gerät	Produktnummer	Hersteller
MembraneSlides	11505158	Leica
Leica LMD 7000 System	-	Leica
0,5ml Thermo-Tube	AB-0350	Thermo Scientific

Durchführung der Lasermikrodissektion:

Eine Struktur oder Zelle wird in der passenden Vergrößerung (meist 10x oder 40x Objektiv) aufgesucht und markiert. Der Laserstrahl umschneidet die Markierung, die Struktur fällt in ein eingespanntes Reaktionsgefäß. In dem Reaktionsgefäß, befindet sich eine kleine Menge Pufferlösung (15 µl), um die herausgeschnittenen Zellen sofort in einem stabilisierenden Milieu zu sichern. In der vorliegenden Arbeit wurde nach der Dissektion die DNA isoliert. Deshalb wurde der Reaktionspuffer (ATL-Puffer) des ersten Schritts der DNA-Isolierung (mit dem Qiagen QIAamp DNA Micro Kits[®]) verwendet.

3.4 Isolierung der DNA

Muskel:

Da Skelett- und Herzmuskel ein relativ homogenes Gewebe darstellen, das fast ausschließlich aus Myozyten besteht, wurde hier die Untersuchung eines Gewebe-Homogenats für ausreichend genau erachtet und auf die Lasermikrodissektion verzichtet. Aus einer kleinen Menge Gewebe, 50-100 µg, wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit dem peqlab peqGOLD Tissue DNA Mini Kit[®] die DNA extrahiert.

Augenmuskel:

Wegen den speziellen Fragestellungen bei der Untersuchung der Augenmuskeln wurde aus gepoolten (10 Stück) und einzelnen Zellen die DNA extrahiert. Verwendet wurde das Qiagen QIAamp DNA Micro Kit[®] nach dem Protokoll des Herstellers für lasermikrodisseziertes Gewebe.

Cortex cerebri und Cerebellum:

Da neuronales Gewebe eher inhomogen, d.h. neben Nervenzellen viele andere Zellen vorhanden sind, wurden einzelne Neuronen gepoolt (25 Zellen) gesammelt und die DNA mit dem Qiagen QIAamp DNA Micro Kit[®] nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert.

Tabelle 3.9: Verbrausmaterial und Chemikalien der DNA-Isolierung.

Verbrauchsmaterial/ Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
Qiagen QIAamp DNA Micro Kit [®]	56304	Qiagen GMBH
Peqlab peqGOLD Tissue DNA Mini Kit [®]	12-2296-01	PEQLAB Biotechnologie GmbH
DEPC-treated Water	AM9922	Ambion

3.5 PCR-Methoden

3.5.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) ermöglicht den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen durch Amplifikation. Das Prinzip ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Eine Abfolge von Reaktionen wird nun mehrmals wiederholt. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs. Es entstehen einzelsträngige DNA-Moleküle. Dann erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer (Annealing) und die Strangsynthese (Extension). Das entscheidende Prinzip ist die sequenzielle Wiederholung dieser Schritte, ein gesuchter DNA-Abschnitt wird exponentiell amplifiziert. Damit die DNA-Polymerase bei den hohen Temperaturen nicht denaturiert, verwendet man thermostabile DNA-Polymerasen aus Bakterien, beispielsweise die Taq-Polymerase, aus dem in heißen Quellen vorkommenden Bakterium *Thermophilus aquaticus*. Die automatisierte Abfolge der Reaktionen in einem Thermocycler ermöglicht die einfache Handhabung und eine Vielzahl von Anwendungen der PCR.

3.5.2 Long-Range nested PCR

Grundlagen:

Die Long-Range PCR:

Long-Range PCR bedeutet, dass hier längere Sequenzen der DNA vervielfältigt werden können als bei der Standard PCR. Bei Verwendung der konventionellen Taq-DNA-Polymerasen können PCR-Produkte (Amplikons) bis etwa 7 kb amplifiziert werden. Dies ist für viele Anwendungen ausreichend, jedoch für die Amp-

lifikation ganzer Genregionen oder, wie im vorliegenden Fall, einem großen Teil (~12kb) des gesamten mitochondrialen Genoms (16,5 kb), ungenügend. Es wurden mittlerweile Methoden etabliert, die die Beschränkung auf etwa 7kb durchbrechen und die Amplifikation von Fragmenten bis zu einer Länge von 40 kb ermöglichen [95]. Bei dieser als Long-Range PCR bezeichneten Methode werden Mischungen zweier thermostabiler DNA-Polymerasen verwendet. Es wird dabei die hohe Umsatzrate der Taq-Polymerase mit der Korrekturlese-Eigenschaft (3'-5'-Exonuklease) einer Proofreading-Polymerase kombiniert. Proofreading-Polymerasen sind die Pfu-Polymerase aus dem Archebakterium *Pyrococcus furiosus* und die Pwo-Polymerase des *Pyrococcus woesei*. Die enorme Steigerung der Produktlänge beruht darauf, dass vorzeitige Abbrüche aufgrund des Einbaus einer falschen Base von der Korrekturlesefunktion des zweiten Enzyms verhindert werden.

Die nested PCR:

Da bei Untersuchungen auf Einzelzell-Ebene nur sehr geringe DNA-Mengen als Ausgangsmaterial für die PCR bereit stehen und die Long-Range PCR mit hoher Genauigkeit nur die Zielsequenz (hier die mtDNA) vervielfältigen soll, wird die Methode der Long-Range PCR mit der Methode der nested PCR kombiniert. Soll eine hohe Zahl an PCR-Zyklen durchgeführt werden, lassen sich mit Hilfe des nested PCR-Verfahrens einige der sonst damit verbundenen Probleme umgehen und die Fehleranfälligkeit bei der Synthese herabsetzen. Man verwendet in zwei PCR-Runden zwei Primer-Paare, wobei mit dem ersten, dem sog. „externen“, Primer-Paar ein normales PCR-Produkt erzeugt wird. Dann wird innerhalb der durch das erste Primer-Paar definierten Sequenz ein weiteres Primer-Paar eingesetzt, die inneren oder „nested“ Primer. In einer zweiten PCR-Runde entsteht ein kürzeres Produkt. Die Produkte einer ersten PCR werden also selbst als Template eingesetzt. Dadurch lässt sich die Produktspezifität steigern. Unspezifische Nebenprodukte der ersten PCR werden in der Regel nicht mehr amplifiziert. So lassen sich auch geringste Mengen Ausgangsmaterial amplifizieren.

Die Gelelektrophorese:

Nachdem die gesuchte DNA-Sequenz amplifiziert wurde, kann man sie mit einer Reihe von Techniken nachweisen und charakterisieren. Die einfachste und am häufigsten verwendete Methode ist die Gelelektrophorese, bei der man kleine Mengen der DNA in einem Agarose- oder Polyacrylamidgel nach ihrer Größe auftrennt. Die DNA wird dabei mit Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden Farbstoff

der in die DNA interkaliert, dargestellt. Durch UV-Bestrahlung wird die DNA im Gel sichtbar und kann fotografisch dokumentiert werden. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden in benachbarten Spuren des Gels Größenmarker (1-kb-Leiter) aufgetragen.

Tabelle 3.10: Verbrauchsmaterialien und Chemikalien der Long-Range nested PCR und Gelektrophorese.

Verbrauchsmaterial/Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
Expand Long Range dNT Pack [®]	04829042N2W	Roche
Ultrapure BSA, Non-Acetylated	AM2616	Ambion
Primer	-	Eurofins MWG GmbH
Tube Strips 0,2 ml	82-0266-A	Peqlab Biotechnologie GmbH
Agarose	840004	Biozym Scientific GmbH
TBE Puffer		
Ethidiumbromid	E1510-10ml	Sigma-Aldrich
Gel Pilot [®] 1kb Ladder	239085	Qiagen
DEPC-treated Water	AM9922	Ambion
GelPilot Loading Dye	124106862	Qiagen

Tabelle 3.11: Geräte der Long-Range nested PCR und der Gelektrophorese:

Gerät	Produktnummer	Hersteller
Thermo Cycler	PTC-200	MJ Research
Gelanalyse	Apagel Midi-Wide Biometra	Biomed Analytik GmbH
Ultraviolett Transluminator	46514	Peqlab Biotechnologie GmbH
Digitalkamera	E990	Nikon

Tabelle 3.12: Primer-Sequenzen der Long-Range nested PCR.

Primer	Sequenz
Hum_Lx_1For	5'-TGAAAACGACGGCCAGTCAGTGACACATGTT-TAACGGC-3'
Hum_Lx_1Rev	5'-CAGGAAACAGCTATGACCTACAAGGACAGGCC-CATTTG-3'
Hum_Lx_2For	5'-TGAAAACGACGGCCAGTTCCATCATAGCAGG-CAGTTG-3'
Hum_Lx_2Rev	5'-CAGGAAACAGCTATGACCAAGGAGTGAGC-CGAAGTTTC-3'

Tabelle 3.13: Protokoll der Long-Range nested PCR.

Ansatz der 1. PCR-Runde mit dem externen Primerpaar	
Buffer	10 µl
dNTP	2,5 µl
Primer F	1,5 µl
Primer R	1,5 µl
Taq	0,75 µl
BSA	10 µl
ddH ₂ O	21,75 µl
Template DNA	2 µl
Gesamt	= 50 µl

Ansatz der 2. PCR-Runde mit dem internalen Primerpaar	
Buffer	10 µl
dNTP	2,5 µl
Primer F	1,5 µl
Primer R	1,5 µl
Taq	0,75 µl
BSA	10 µl
ddH ₂ O	21,75 µl
Produkt aus Runde 1	2 µl
Gesamt	= 50 µl

Anmerkungen: Der angegebene BSA Puffer muss direkt vor Verwendung noch 1:100 verdünnt werden, die Primer sollen 10nM vorliegen. Man erhält 50µl Gesamtreaktionsvolumen pro eingesetzter DNA-Probe. Das Produkt der ersten PCR-Runde muss vor der 2. PCR-Runde mit hochreinem Wasser verdünnt werden. Die Verdünnung muss im Einzelfall angepasst werden, bei den Einzelzellen betrug sie 1:10 bis 1:20 und bei den gepoolten Zellen 1:10 bis 1:40. Bei allen PCR-Läufen wurde eine Negativkontrolle ohne DNA (Produkt einer Extraktion ohne Zellen) mitbearbeitet.

Tabelle 3.14: Programm des Thermocyclers.

1. PCR-Runde mit dem externen Primerpaar		
Nr.	Temperatur	Zeit
1	92°C	120 Sekunden
2	92°C	10 Sekunden
3	59°C	15 Sekunden
4	68°C	13 Minuten
5	Schritte 2-4 9mal wiederholen (insgesamt 10 Zyklen)	
6	92°C	10 Sekunden
7	59°C	15 Sekunden
8	68°C	13 Minuten +20 Sek./Zyklus
9	Schritte 6-8 9mal wiederholen (insgesamt 10 Zyklen)	
10	68°C	7 Minuten
11	4°C	endlos
2. PCR-Runde mit dem internalen Primerpaar		
Nr.	Temperatur	Zeit
1	92°C	120 Sekunden
2	92°C	10 Sekunden
3	59°C	15 Sekunden
4	68°C	12 Minuten
5	Schritte 2-4 9mal wiederholen (insgesamt 10 Zyklen)	
6	92°C	10 Sekunden
7	59°C	15 Sekunden
8	68°C	12 Minuten +Sek./Zyklus
9	Schritte 6-8 19mal wiederholen (insgesamt 20 Zyklen)	
10	68°C	7 Minuten
11	4°C	endlos

Tabelle 3.15: Protokoll der Gelelektrophorese.

0,9% Agarose Gel	
	1. 1,8 g Agarose in 200 ml TBE Puffer geben
	2. Gemisch vorsichtig erhitzen, nicht kochen, bis die Agarose gelöst ist. Dann 3-4 Minuten abkühlen lassen.
	3. 9 µl Ethidiumbromid in die 200 ml pipettieren, vorsichtig mischen.
	4. In die vorbereitete Form gießen.
	5. 1-2 Stunden abkühlen lassen bis das Gel fest ist.
Elektrophorese	
	6. Das Gel in das Elektrophoresebad geben
	7. Je 10 µl des Produkts der 2. PCR-Runde auf einen Parafilm geben und dann mit je 2 µl des Ladepuffers (DMSO) in einer Pipettenspitze mischen.
	8. Die Vertiefungen des Gels mit diesem Gemisch beladen
	9. In eine der Spuren die oben erwähnte Negativkontrolle und links und rechts aller beladenen Spuren je 5 µl der 1-kb-Ladder auf eine benachbarte Spur laden.
	10. Kabel anschließen und die Spannung auf 44V einstellen.
	11. 60 oder 120 Minuten laufen lassen.
Dokumentation	
	12. Gel aus dem Bad nehmen und vorsichtig auf den UV-Transluminator geben.
	13. Abdeckung und Digitalkamera aufsetzen.
	14. UV-Licht einschalten und Photographieren

3.5.3 Quantitative Real-time PCR

Grundlagen:

Bei der herkömmlichen PCR wird eine DNA-Sequenz amplifiziert und anschließend in der Gelelektrophorese charakterisiert. Hierbei kann nur wenig über die Menge des Ausgangsmaterials ausgesagt werden, da diese Methode nicht quantitativ ist. Direkte Nachweismethoden der DNA ermöglichen die Analyse des Amplikons während der Amplifizierung. Zu den direkten Nachweisverfahren zählen Real-time PCR Systeme. Dabei werden die PCR-Produkte durch Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden markiert und der Fluoreszenzanstieg detektiert. Im hier verwendeten System werden dabei sequenzspezifische Sondenmoleküle (Probes) eingesetzt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter

und einem Quencher-Molekül markiert sind (z.B. TaqMan®-Sonden). Der Quencher unterdrückt zunächst die Fluoreszenzemission des Reporters. Während des Annealing-Schrittes binden neben den sequenzspezifischen PCR-Primern auch die Fluoreszenzsonden, dabei erhält man aber kein Fluoreszenzsignal, da der Quencher das Signal unterdrückt. Erst während der Synthese des Zweitstrangs, wenn die Taq-Polymerase die Sonde erreicht, spaltet die 5'-3'-Exonuklease die Sonde und Quencher und Reporter werden getrennt. So führt die Anregung des Reporters zu der Fluoreszenzemission einer definierten Wellenlänge, diese wird messtechnisch vom verwendeten Thermocycler am Ende der Extension jedes PCR-Zyklus erfasst (sozusagen in „Echtzeit“). Die gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur Menge der eingesetzten DNA [96].

Die Bestimmung des CT-Werts:

Die Fluoreszenz-Werte werden von dem Realtime PCR-Gerät aufgezeichnet und in Kurven aufgetragen. Diese Kurven zeigen nach einem exponentiellen Anstieg die Annäherung an einen Maximalwert (der durch den Verbrauch der vorhandenen Ausgangsstoffe und den Funktionsverlust der Polymerase verursacht wird). Der Anstieg setzt für jedes Well (Vertiefung in der Platte), für jedes Ausgangsmaterial, zu einem anderen Zeitpunkt ein, je nachdem wie viel Ausgangsmaterial amplifiziert werden kann.

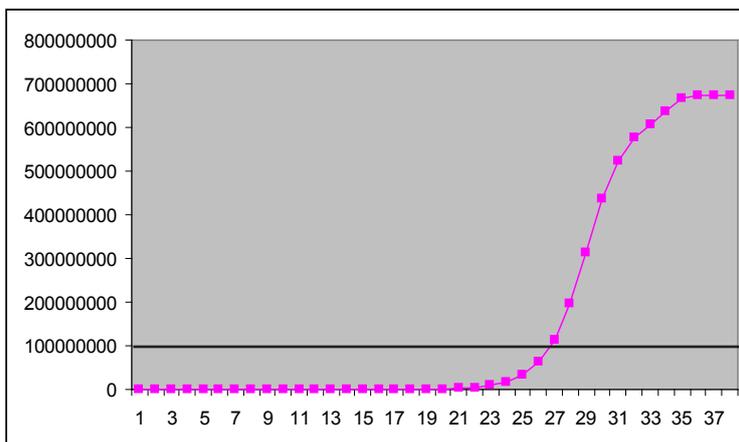


Abbildung 3.2: Diagramm der Zyklenzahl (Abszisse) gegen die Fluoreszenz (Ordinate, relatives Maß).

Wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, vergehen relativ viele PCR Zyklen ohne einen detektierbaren Anstieg der Fluoreszenz, besonders da ein unspezifisches Hintergrundrauschen nicht zu vermeiden ist. Der auf diese Phase folgende erkennbare steile Anstieg endet relativ schnell in der Plateauphase. Wie in Abb. 3.3 zu sehen, sind in der logarithmischen Darstellung geringe Unterschiede in den frühen Zyklen

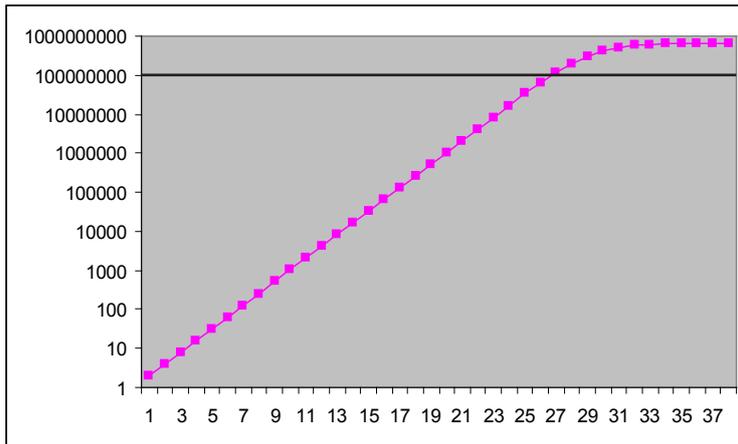


Abbildung 3.3: Logarithmische Darstellung von Abb. 3.2. Die Werte der Ordinate als Logarithmus der vorhergehenden Abbildung.

besser zu beurteilen. Im Vergleich der beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass der exponentielle Bereich (d.h. linear in Abb. 3.3) sich auf den Beginn der Kurve in Abb. 3.2 projiziert (schwarze Linien). In diesem Bereich des exponentiellen Anstiegs legt man einen Grenzwert der Fluoreszenz (Threshold) fest, dem die jeweilige Zykluszahl auf der Abszisse zugewiesen wird.

Diesen Wert auf der Abszisse bezeichnet man als CT-Wert („cycle threshold“). Der CT-Wert dient als Maß für die Menge der ursprünglich eingesetzten DNA, denn wenn zu Beginn der Amplifikation wenig DNA mit der gesuchten Sequenz vorhanden ist, wird der Grenzwert (Threshold) später überschritten (hoher CT-Wert) und wenn zu Beginn viel DNA mit der gesuchten Sequenz vorhanden ist, wird der Grenzwert früher überschritten (niedriger CT-Wert). Moderne Real-time PCR-Geräte, wie das hier verwendete, legen den Grenzwert (Threshold) automatisch fest.

Die Bestimmung der Deletionswerte:

Es existieren verschiedene experimentelle Ansätze und Rechenmodelle, wie die CT-Werte der Real-time PCR zur Quantifizierung eines Gens verwendet werden können. Dabei kann man relative und absolute Quantifizierung unterscheiden. Zunächst wird auf die Bestimmung des Anteils der mtDNA mit Deletionen (= Δ mtDNA-Anteil) eingegangen. Da es sich um einen Anteil handelt, ist eine relative Quantifizierung ausreichend.

Im Zentrum des Ansatzes steht eine besondere Eigenschaft des mitochondrialen Genoms. Fast alle gefundenen Deletionen der mtDNA liegen im Bereich des großen Bogens (major arc). In diesem Bereich liegt das Gen ND4. Nur sehr selten findet man Deletionen im Bereich des kleinen Bogens (minor arc), dort liegt das ND1-Gen. Diese Verteilung wird sowohl bei spezifischen Deletionen [19] als auch bei altersabhängig entstandenen Deletionen gesehen [97]. Das ND1-Gen liegt

in 94% der Fälle mit einzelnen Deletionen und in 100% der Fälle mit multiplen Deletionen im erhaltenem Teil des mitochondrialen Genoms, während das ND4-Gen in 82% der Fälle mit einzelnen Deletionen und in 96% der Fälle mit multiplen Deletionen gelöscht wurde [98]. Bei altersabhängigen somatischen Deletionen der mtDNA in Myozyten wurden 96% der mtDNA Deletionen im Bereich des großen Bogens gefunden [97, 98]. So können aus dem Verhältnis der beiden Gene in einer Zelle oder einem Gewebe Rückschlüsse auf den Δ mtDNA-Anteil gezogen werden. Um dabei die Ergebnisse zu normieren, d.h. möglichst unabhängig von Artefakten und Störfaktoren des Ansatzes zu machen, bezieht man mtDNA aus dem Blut ein, die keine Deletionen zeigt. Folgende Formel dient zur Berechnung des Deletionswerts:

$$\text{Gl.1 } \Delta\text{mtDNA} = (1 - 2^{-\text{Std}\Delta\Delta\text{CT}}) * 100$$

Diese Formel ist eine modifizierte Form der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode zur relativen Quantifizierung (Gl. 2.1 bis 2.3). $\Delta\Delta\text{CT}$ ist die Differenz des ΔCT -Werts eines Experiments und einer Kontrolle. Die ΔCT Werte sind Differenzen der CT-Werte des Zielgens und des Referenzgens.

$$\text{Gl. 2.1 } \Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{exp}} - \Delta\text{CT}_{\text{con}}$$

wobei:

$$\text{Gl. 2.2 } \Delta\text{CT}_{\text{exp}} = \text{CT}_{\text{tar/exp}} - \text{CT}_{\text{ref/exp}} \text{ und Gl. 2.3 } \Delta\text{CT}_{\text{con}} = \text{CT}_{\text{tar/con}} - \text{CT}_{\text{ref/con}}$$

Bei der Bestimmung des Deletionswertes ist die Untersuchung des Gewebes das Experiment (hier werden Unterschiede erwartet) und die Untersuchung des Blutes die Kontrolle. Um eine höhere Genauigkeit zu erzielen modifiziert man Gl.2.3, den ΔCT -Wert der Kontrolle. Dafür benötigt man Standardkurven (Abb.3.4) für die beiden Gene (Zielgen ND4 und Referenzgen ND1). Für die Standardkurve erstellt man eine Verdünnungsreihe der Blut-DNA mit 1:10 Verdünnungsschritten. Die Verdünnungsreihe wird bei jedem PCR-Ansatz mit aufgetragen, die erhaltenen CT-Werte werden in einem Diagramm gegen die Verdünnungsschritte aufgetragen. Man erkennt einen linearen Zusammenhang in Form einer Geraden, die Standardkurve. Für jedes Gen erhält man eine Standardkurve und zu jeder Standardkurve eine Geradengleichung $y=x*m+A$ mit der Steigung m und dem Nulldurchtritt A (siehe Abb. 3.4). Die Geradengleichung der ND1 Standardkurve

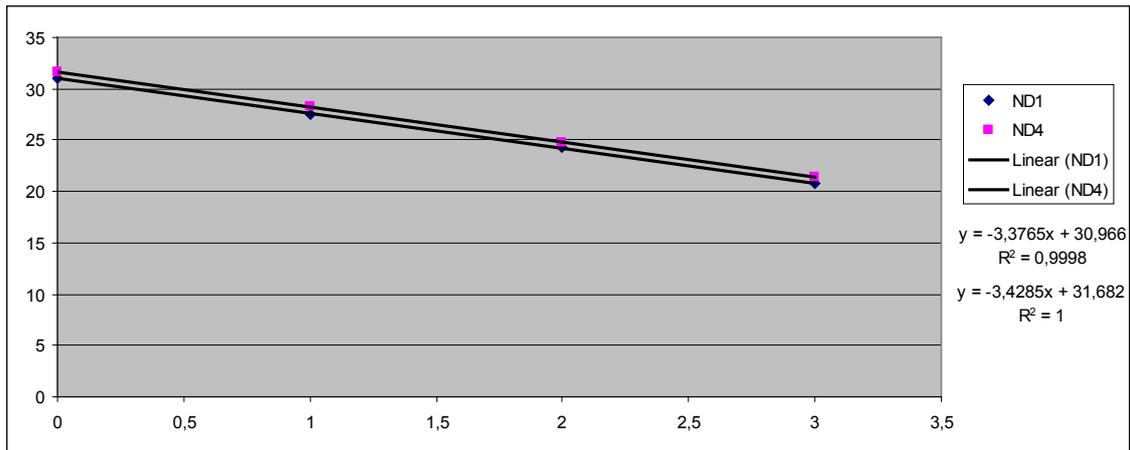


Abbildung 3.4: Standardkurve; Hier sind die Verdünnungstufen (eine logarithmische Skala, Abszisse) gegen die zugehörigen CT-Werte (Ordinate) aufgetragen. Die Verdünnungstufen sind vereinfachend als 0-3 bezeichnet.

löst man nach x auf und setzt sie in die Geradengleichung von ND4 ein. Der y-Wert der zusammengesetzten Gleichung entspricht einem standardisierten CT-Wert (StdND4) für ND4, zugeordnet jedem CT-Wert ND1 der Blut-mtDNA. Das standardisierte Std Δ CT erhält man durch Subtraktion des ND1 CT-Werts vom StdND4 CT -Werte (Gl. 3.1) [98, 99]. Der Δ CT_{exp}-Wert wird durch Subtraktion des ND1 CT-Werts vom ND4 CT-Wert der zu untersuchenden Probe gebildet.

$$\text{Gl. 3.1 } \text{Std}\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{StdND4}} - \text{CT}_{\text{ND1}}$$

$$\text{Gl. 3.2 } \text{Std}\Delta\Delta\text{CT} = \text{Std}\Delta\text{CT} - \Delta\text{CT}_{\text{exp}}$$

Std $\Delta\Delta$ CT verwendet man in Gl.1 und erhält so den Anteil an mtDNA, der Deletionen zeigt. In vorangehenden Arbeiten wurde die Gleichwertigkeit dieser Methode mit bereits validierten Methoden wie dem Southern Blot nachgewiesen [67, 98].

Die Bestimmung der Copynumber:

In einem weiteren Untersuchungsschritt sollte die Anzahl der mtDNA Moleküle in jeder untersuchten Zelle festgestellt werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe einer klonierten mtDNA mit einer bekannten Kopienzahl pro μ l vom ND1-Gen erstellt. Mit der real-time PCR erhält man CT-Werte für die jeweilige Verdünnung, diese werden in einer Graphik gegen den Logarithmus der Kopienzahl pro μ l aufgetragen. Der CT-Wert der untersuchten Probe wird in die Geradengleichung

der resultierenden Gerade eingesetzt und der erhaltene Wert als Exponent von 2 gesetzt. Die so erhaltene Kopienzahl pro μl werden mit Hilfe des eingesetzten mtDNA Lösungsvolumens ($=30 \mu\text{l}$) und der eingesetzten Zellzahl pro mtDNA Lösung in Kopienzahl pro Zelle umgerechnet (bei Einzelzellen Faktor 30 und bei gepoolten Zellen Faktor 3). In Muskel-Homogenat konnte diese Methode aufgrund der unbekanntem Zahl an Zellen in jeder Probe nicht durchgeführt werden. Hier wurde das nukleäre Gen von Cyp2E1 zum relativen Vergleich in der Real-time PCR mituntersucht und so ein Wert „relative Häufigkeit“ für jede Muskelprobe festgelegt.

Tabelle 3.16: Verbrauchsmaterialien und Chemikalien für die Real-time PCR.

Verbrauchsmaterial/Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
TaqMan GenEx Master Mix [®]	4369510	Applied Biosystems
Tris Puffer 1M pH8 100 ml	9855G	Ambion
Primer	4304971	Applied Biosystems
MGB-Probes	4316034	Applied Biosystems
DEPC-treated Water	AM9922	Ambion
MicroAmp [®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml	4346906	Applied Biosystems
MicroAmp [®] Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems

Tabelle 3.17: Primer-Sequenzen der Real-time PCR.

Primer	Sequenz
HumND4_L	5'-CCA TTC TCC TCC TAT CCC TCAAC-3'
HumND4_H	5'-CAC AAT CTG ATG TTT TGG TTA AAC TAT ATT T-3'
HumND1_L	5'-CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT-3'
HumND1_H	5'-GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T-3'

Tabelle 3.18 Probe-Sequenzen der Real-time PCR.

Probe	Sequenz
ND1_VIC_MGB	5'-CCA TCA CCC TCT ACA TCA-3'
ND4_6FAM_MGB	5'-CCG ACA TCA TTA CCG GGT T-3'

Tabelle 3.19: Real-time PCR Gerät.

Gerät	Produktnummer	Hersteller
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	4376598	Applied Biosystems

Tabelle 3.20: Reaktionsansatz der Real-time PCR.

Reagenz	endgültige Konzentration	Volumen pro eingesetzter DNA
TagMan GenEx Master Mix	-	12,50 µl
Primer HumND4_L	900 nM	0,23 µl
Primer HumND4_H	900 nM	0,23 µl
Primer HumND1_L	900 nM	0,23 µl
Primer HumND1_H	900 nM	0,23 µl
Probe ND1_VIC_MGB	250 nM	1,25 µl
Probe ND4_6FAM_MGB	250 nM	1,25 µl
DEPC-treated Water	-	7,80 µl
Template (DNA)	-	3 µl
	= Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 3.21: Programm des Real-time PCR Geräts.

	Temperatur	Zeit
1. Stufe	50°C	2 min
	95°C	10 min
2. Stufe	95°C	15 sec
(40 x)	60°C	1 min

3.6 Bestimmung der Häufigkeit COX-defizienter Zellen

Es wurden eindeutig COX-negative Zellen in den Schnitten des M. iliopsoas, des Myokards und der äußeren Augenmuskulatur gezählt und die Gesamt-Schnittfläche mittels des Lasermikrodissektions-Mikroskops bestimmt. Die Zahl der gefundenen COX-negativer Muskelzellen pro Schnitt wurde auf die Schnittflächen bezogen und in Zellen pro mm² angegeben. Zum Vergleich der verschiedenen Muskelgewebe (M. iliopsoas, Myokard und äußere Augenmuskulatur) wurden drei Gruppen mit möglichst gleicher Altersverteilung analysiert.

3.7 Statistik

3.7.1 Quantifizierung COX-defizienter Myozyten

Variablen und deskriptive Statistik:

Ergebnisse in der Einheit Zellen pro mm^2 wurden in einem Punktdiagramm gegen das Alter zum Todeszeitpunkt in Jahren auf der Abszisse eingetragen. Eine Regressionsgerade durch die Punktwolke, erstellt mit der Methode der kleinsten Quadrate, definiert einen Regressionskoeffizienten b_1 , der der Steigung der Geraden mit der Gleichung $y=b_1*x+b_0$ entspricht.

Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet, um die Güte der Vorhersage des Merkmals „Anteil COX-negativer Zellen“ durch das unabhängige Merkmal „Alter“ durch die Regressionsgerade zu beurteilen. Durch einen Residuenplot und einen QQ-Plot wurde die Parametrik als Voraussetzung für ein einfaches lineares Regressionsmodell nachgewiesen.

Hypothese und induktive Statistik:

Die Nullhypothese lautet:

$H(0)$: Es gibt keine signifikante Zunahme des Anteils COX-negativer Zellen mit dem Alter ($b_1 \leq 0$).

Die Alternativhypothese:

$H(1)$: Es gibt eine signifikante Zunahme des Anteils COX-negativer Zellen mit dem Alter ($b_1 > 0$).

Die Regressionsprüfung wurde analog dem t-Test mit der Testgröße $T = b_1/SE(b_1)$ durchgeführt und das Konfidenzintervall für b_1 bestimmt, mit einem angestrebten Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$.

Zum Vergleich der verschiedenen Muskelgewebe untereinander wurden Altersgematchte Gruppen gebildet. In diesen Gruppen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Häufigkeiten COX-negativer Zellen gebildet und mit einem zweiseitigen T-Test für unverbundene Stichproben verglichen.

3.7.2 Vergleich COX-defizienter Myozyten mit COX-normalen Myozyten

Variablen und deskriptive Statistik:

Der Anteil von mtDNA Molekülen mit Deletionen wurde für beide Zellarten mit der Realtime-PCR Methode bestimmt. Dabei wurden einmal die DNA gepoolter

(10 Stück) Zellen und einmal die DNA von einzelnen Zellen ausgewertet. Für alle Gewebeproben einer Altersgruppe, aufgeteilt in gepoolte und einzelne Myozyten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Deletionsanteils für jeweils eine Zellart berechnet. Die Ergebnisse wurden in einem Box and Whiskers Plot anschaulich gemacht.

Hypothese und induktive Statistik

Die Nullhypothese lautet:

H(0): Es gibt keinen signifikanten Unterschied des Anteils an Deletionen zwischen COX-negativen und COX-positiven Zellen.

Die Alternativhypothese:

H(1): Es gibt einen Unterschied des Anteils an Deletionen zwischen COX-negativen und COX-positiven Zellen.

Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen T-Test für unverbundene Stichproben nachgewiesen, mit einem angestrebten Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$.

3.7.3 Deletionen der mtDNA mit zunehmendem Alter

Variablen und deskriptive Statistik:

Für jede bearbeitete Probe wurde mit real-time PCR der Δ mtDNA-Anteil bestimmt, ausgedrückt durch 0% bis 100%. Das Ergebnis wurde in einer Punktwolke gegen das Alter zum Todeszeitpunkt in Jahren (auf der Abszisse) eingetragen.

Eine Regressionsgerade durch die Punktwolke, erstellt mit der Methode der kleinsten Quadrate, erhält einen Regressionskoeffizienten b_1 , die Steigung der Geraden mit der Gleichung $y = b_1 \cdot x + b_0$.

Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet, um die Güte der Vorhersage des Merkmals „Anteil COX-negativer Zellen“ durch das unabhängige Merkmal „Alter“ durch die Regressionsgerade zu beurteilen. Durch einen Residuenplot und einen QQ-Plot wurde die Parametrik als Voraussetzung für ein einfaches lineares Regressionsmodell nachgewiesen.

Hypothese und induktive Statistik:

Die Nullhypothese lautet:

H(0): Es gibt keine signifikante Zunahme des Δ mtDNA-Anteils mit dem Alter ($b_1 \leq 0$).

Die Alternativhypothese:

H(1): Es gibt eine signifikante Zunahme des Δ mtDNA-Anteils mit dem Alter

($b_1 > 0$).

Die Regressionsprüfung wurde analog dem t-Test mit der Testgröße $T = b_1/SE(b_1)$ durchgeführt und das Konfidenzintervall für b_1 bestimmt, mit einem angestrebten Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$.

Die Varianzanalyse der Mittelwerte der untersuchten Gewebe wurde mit einfaktorieller ANOVA durchgeführt. Die Nullhypothese lautet:

$H(0)$ Die Gruppenmittelwerte der $\Delta mtDNA$ -Anteile aller untersuchten Gewebe unterscheiden sich nicht.

Die Alternativhypothese:

$H(1)$: Es besteht ein Unterschied zwischen den Gruppenmittelwerten der untersuchten Gewebe.

3.7.4 Untersuchung der mtDNA-Kopienzahlen

Es wurde die bivariate Korrelation der Faktoren Alter und Kopienzahl bzw. relative Häufigkeit bestimmt. Dazu wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet.

Hypothese und induktive Statistik:

Die Nullhypothese lautet:

$H(0)$: Es gibt keine signifikante Zunahme der mtDNA-Kopienzahl oder der relativen Häufigkeit mit dem Alter ($b_1 \leq 0$).

Die Alternativhypothese:

$H(1)$: Es gibt eine signifikante Zunahme der mtDNA-Kopienzahl oder der relativen Häufigkeit mit dem Alter ($b_1 > 0$).

Die Regressionsprüfung wurde analog dem t-Test mit der Testgröße $T = b_1/SE(b_1)$ durchgeführt und das Konfidenzintervall für b_1 bestimmt, mit einem angestrebten Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$.

Die Mittelwerte der Gewebe wurden mit einem zweiseitigen T-Test oder der Varianzanalyse mit einfaktorieller ANOVA bestimmt. Als Post-Hoc-Test wurde die Scheffé-Prozedur angewendet.

Material: Alle Berechnungen wurden mit der Software PASW Statistics 18 (SPSS IBM®) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung COX-defizienter Myozyten

Durch die histochemische COX-SDH-Färbung sollten Funktionsverluste des durch die mtDNA kodierten Komplexes IV (COX) der Atmungskette detektiert werden. Es wurde seriell zuerst Cytochrom C Oxidase (COX, brauner Farbstoff, DAB) und anschließend Succinat Dehydrogenase (SDH, blauer Farbstoff, NBT) gefärbt.



*Abbildung 4.1 :
COX-SDH Färbung eines
Skelettmuskelschnittes
einer normal gealterten
Person. Deutlich ist eine
blaue COX-negative Zelle
zu erkennen (Pfeil).*

4.1.1 Quantifizierung der Häufigkeit COX-defizienter Myozyten

Die Auszählung COX-negativer Zellen in COX-SDH-gefärbten histologischen Schnitten des Herz- und Skelettmuskeln zeigte eine Häufung COX-negativer Zellen in höheren Lebensaltern. In neuronalen Geweben war eine solche Quantifizierung leider nicht möglich, da keine COX-defizienten Zellen in den Färbungen gefunden werden konnten. In den Abb. 4.2 und 4.3 sind die Ergebnisse des Herz- und Skelettmuskels graphisch dargestellt.

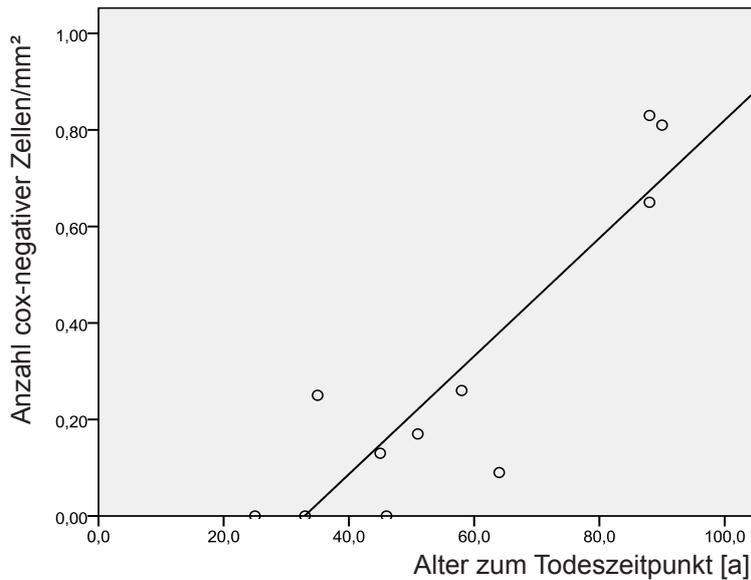


Abbildung 4.2:
Zunahme der Häufigkeit COX-negativer Zellen mit dem Alter in Schnitten des *M. iliopsoas* von n=11 Personen. Die Fläche der auswertbaren Areale der gefärbten Schnitte wurde gemessen und eindeutig COX-negative Zellen gezählt. $r^2=0,793$; $p<0,01$.

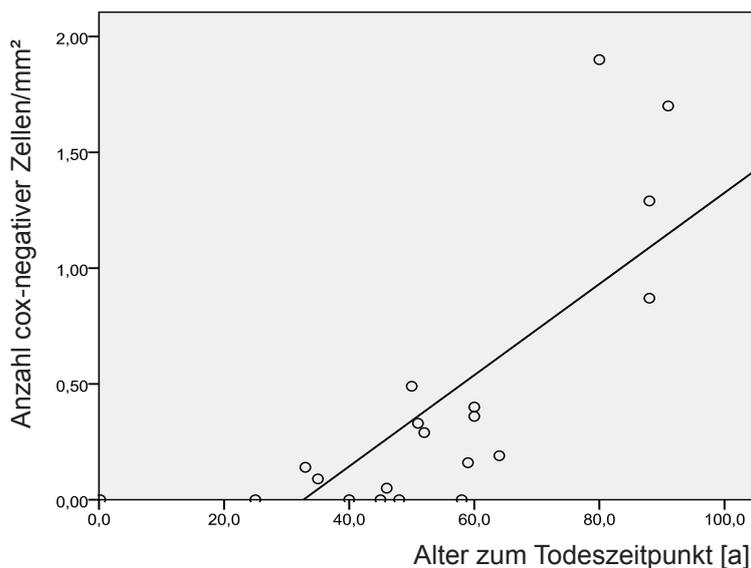


Abbildung 4.3:
Zunahme der Häufigkeit COX-negativer Zellen mit dem Alter in Schnitten des Myokards von n=19 Personen. Die Fläche der auswertbaren Areale der gefärbten Schnitte wurde gemessen und eindeutig COX-negative Zellen gezählt. $r^2= 0,583$; $p<0,01$.

4.1.2 COX-Defizienz in verschiedenen Muskelgeweben

Der Vergleich der verschiedenen untersuchten Muskelarten (*M. iliopsoas*, Myokard und äußere Augenmuskulatur) zeigte die meisten COX-negativen Zellen in den Augenmuskeln ($21,11 \pm 4,46$ Zellen/mm², n=5). Die Häufigkeit COX-negativer Muskelzellen ist in diesem Gewebe hoch-signifikant höher als in Gewebe des *M. iliopsoas* ($0,53 \pm 0,34$ Zellen/mm², n=5, $p<0,001$) und des Myokards ($1,19 \pm 0,68$ Zellen/mm², n=5, $p<0,001$, siehe Abb. 4.4). Ein statistischer Trend zeigte sich im Unterschied zwischen den etwas höheren Werten in Proben des Myo-

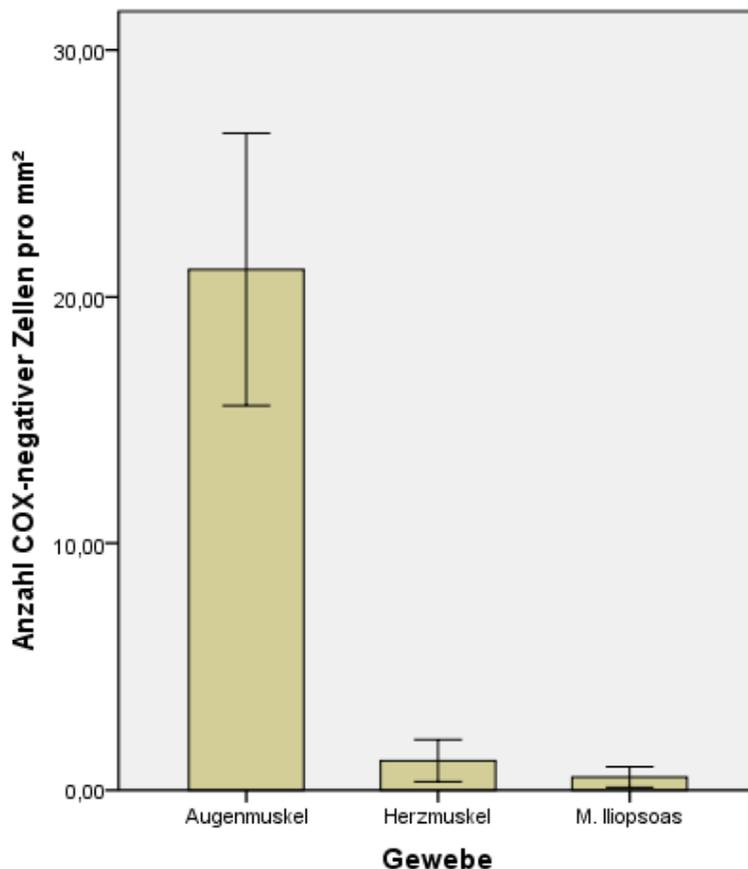


Abbildung 4.4: Mittlere Anzahl COX-negativer Zellen in histologischen Schnitten verschiedener Muskelgewebe. In äußerer Augenmuskulatur sind signifikant mehr COX-negative Zellen als in Herzmuskulatur ($p < 0,001$) und Skelettmuskulatur ($p < 0,001$) enthalten.

kards und den Ergebnissen des M. iliopsoas ($p = 0,088$). Die Altersverteilung der untersuchten Gruppen wurde dabei möglichst homogen gestaltet (Mittelwert des Alters \pm Standardabweichung in der untersuchten Gruppen: Augenmuskeln 79 \pm 8 Jahre, M.iliopsoas = 78 \pm 15 Jahre, Myokard = 82 \pm 11 Jahre). Es bestand kein signifikanter Altersunterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,825$).

4.1.3 COX-Defizienz und Deletionen der mtDNA

Quantitative Bestimmung der Δ mtDNA-Anteile:

Es wurden die Δ mtDNA-Anteile COX-defizienter sowie COX-positiver Augenmuskelzellen verglichen. Es zeigten sich sowohl in gepoolten Zellen als auch in Einzelzellen signifikant höhere Δ -mtDNA-Anteile COX-defizienter Myozyten (bei gepoolten Zellen 67 \pm 23% vs. 18 \pm 22%; $n = 22$; $p < 0,05$ und bei Einzelzellen 75 \pm 23% vs. 23 \pm 19%; $n = 20$; $p < 0,05$). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.5 und 4.6 graphisch dargestellt. Manche der Proben mit einzelnen Zellen enthielten zu geringe oder keine messbare Menge an mtDNA. Bei 40 verarbeiteten Proben mit einzelnen Zellen war dies bei 10 Proben der Fall. Unter der Annahme, dass bei diesen Proben die mit der Lasermikrodissektion isolierte Zelle nicht von dem Reaktionsgefäß zur Weiterverarbeitung aufgefangen wurde, wurden die Ergebnisse

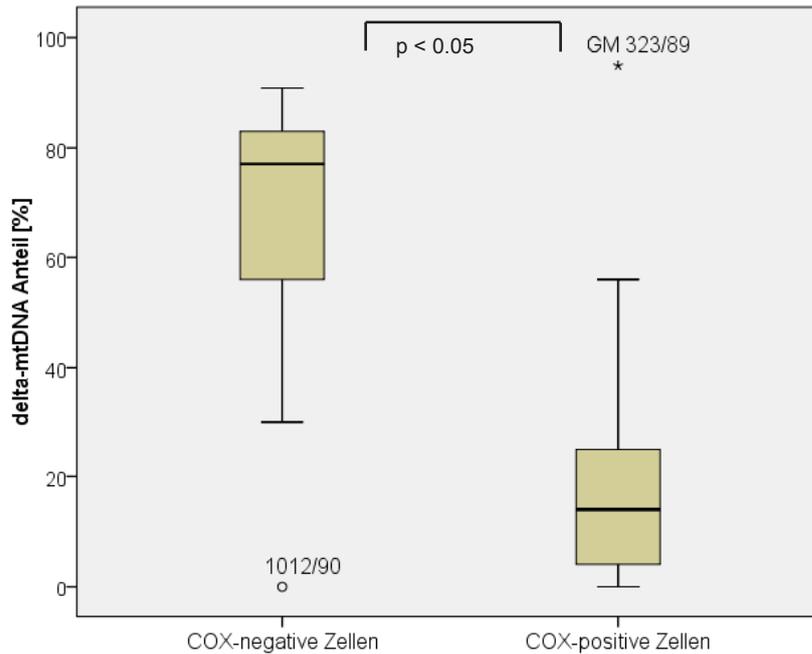


Abbildung 4.5:
Box-Whiskers Plot
der Δ -mtDNA-
Anteile von je 10
gepoolten einzelnen
Augenmuskelzel-
len. COX-negative
Zellen und COX-
positive Zellen von
 $n=22$ Personen.

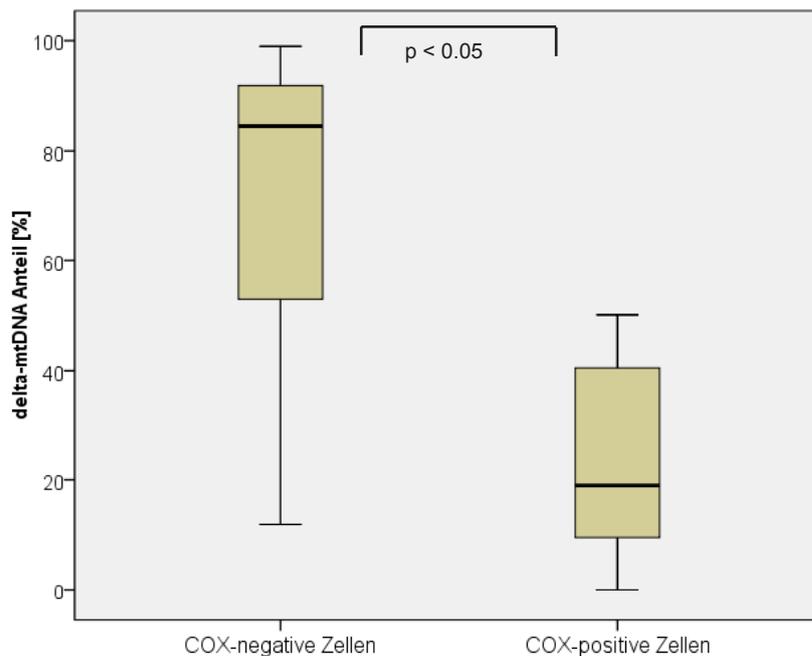


Abbildung 4.6:
Box-Whiskers-Plot
der Δ -mtDNA-
Anteile von je einer
einzelnen Augen-
muskelzelle. COX-
negative Zellen
und COX-positive
Zellen von $n=20$
Personen.

dieser Zellen nicht in der Auswertung berücksichtigt. Bei den gepoolten Proben war in jeder der 20 verarbeiteten Proben eine ausreichende Menge mtDNA vorhanden. Keine Probe wurde aus der Wertung genommen.

Qualitativer Nachweis von Deletionen der mtDNA:

In der Gelelektrophorese des Amplifikats der Long-Range nested PCR ist zu erkennen, dass in jeder COX-negativen Zelle eine individuelle singuläre Deletion der mtDNA gefunden wurde, die für die hohe Deletionslast verantwortlich sein könnte (Abb. 4.7 und 4.8). Die Bahnen der gepoolten Zellen zeigen mehrere Banden:

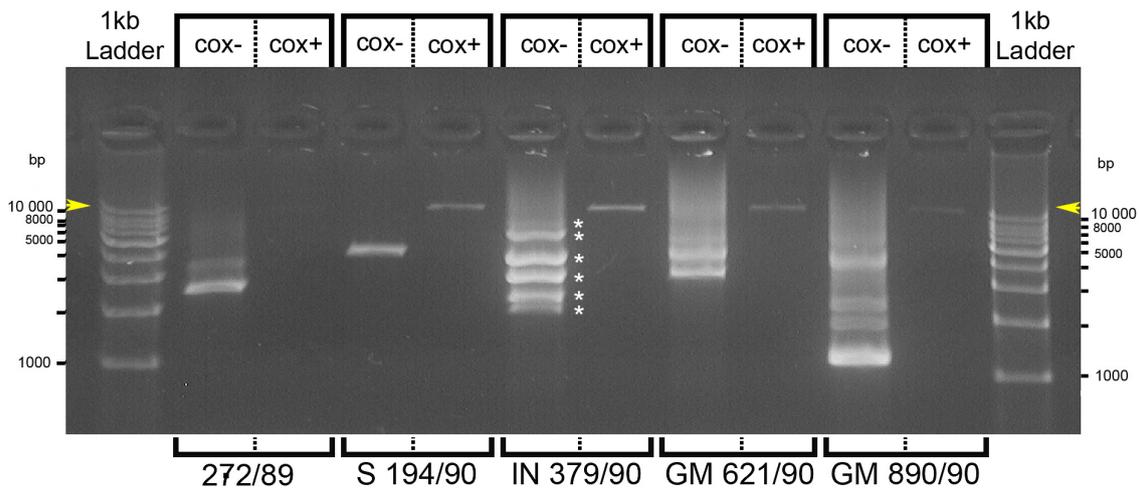


Abbildung 4.7: Long-Range nested PCR von je 10 gepoolten Augenmuskeln pro Bahn. Die Zellen wurden mit Lasermikrodissektion aus COX-SDH-gefärbten Muskelschnitten von 5 verschiedenen Personen (272/90, S194/90, IN 379/90, GM 621/90, GM 890/90) gewonnen. Auf benachbarten Bahnen sind die COX-negativen neben den COX-positiven Zellen der jeweiligen Person aufgetragen. Die Höhe der wt-Banden wurde mit Pfeilen markiert. Deletionen wurden bei Probe IN379/90 zur Verdeutlichung mit Sternen markiert

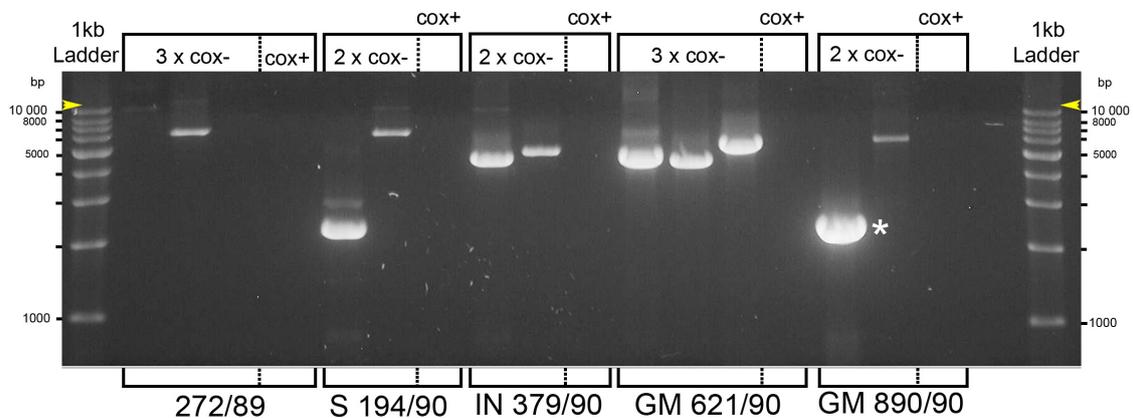


Abbildung 4.8: Long-Range nested PCR von je einer einzelnen Augenmuskelfelle pro Bahn. Die Zellen stammen von den gleichen Personen wie die Zellen in Abb. 4.7. Auf benachbarten Bahnen sind mehrere COX-negative Zellen und eine COX-positive Zelle der jeweiligen Person aufgetragen. Die Höhe der erwarteten wt-Bande wurde mit Pfeilen markiert. Die Deletion der Probe GM 890/90 wurde mit einem Stern markiert.

zwischen einer und sechs Banden (Bsp. Probe IN 379/90, 6 Deletionen mit * markiert). In den Bahnen der Einzelzellen zeigt jede Zelle nur eine Deletions-Bande (Bsp. Probe GM 890/90, die Deletion mit * markiert). Einzelne Bahnen ohne Banden können durch möglicherweise fehlende Zellen in diesen Proben erklärt werden. Bei der Lasermikrodissektion kann vermutlich nicht jede Zelle aufgefangen werden. Auch ist bei den Proben der gepoolten Einzelzellen zu erkennen, dass nicht jeweils 10 Deletions-Banden für 10 Lasermikrodissizierte Zellen vorhanden sind. Die Deletionen der einzelnen COX-negativen Zellen sind individuell verschieden groß, die Länge variiert zwischen ca. 1500 bp bis ca. 6000 bp. Keine Deletion gleicht in dieser Untersuchung der Anderen. Auch verschiedene COX-negative Zellen derselben Person zeigen in jeder Zelle eine andere Deletion. COX-positive Zellen zeigen keine Deletionen. Eine schwache wt-Bande ist bei fast allen gepoolten COX-positiven Zellen zu erkennen, die Bande entspricht der Länge des von den beiden Primer-Paaren umschlossenen Segments von etwa 13 kb. Die wt-Bande liegt bei verschiedenen Personen an der gleichen Stelle. Bei einzelnen COX-positiven Zellen ist keine Bande zu erkennen.

4.2 Deletionen der mtDNA im Alterungsprozess

4.2.1 Korrelation zwischen Alter und Δ mtDNA-Anteil

Es wurden Δ mtDNA-Anteile in verschiedenen Geweben bestimmt. In Herz- und Skelettmuskel wurde mtDNA aus Gewebe-Homogenat untersucht, da diese Gewebe sehr homogen aufgebaut sind. In den neuronalen Geweben, die durch einen hohen Anteil verschiedener Gliazellen als heterogen zu bezeichnen sind, wurden einzelne, phänotypisch unauffällige Neurone mit der Lasermikrodissektion aus dem Gewebe herausgetrennt und jeweils ein Pool von 25 Zellen in einem Reaktionsgefäß gesammelt und weiterverarbeitet.

In keinem der Gewebe konnte ein statistisch signifikanter Anstieg des Δ mtDNA-Anteils mit dem Alter festgestellt werden (siehe Abb. 4.9-4.13).

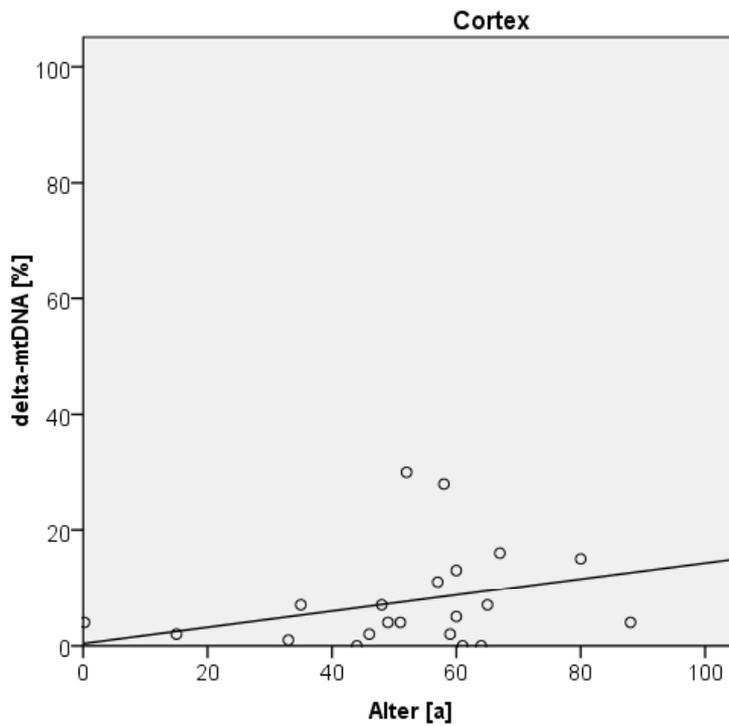


Abbildung 4.9:
 Δ mtDNA-Anteile im Cortex cerebri. Es wurden je 25 Neurone von 21 Personen in einem Reaktionsgefäß gesammelt und untersucht. Es ist kein signifikanter Anstieg des Δ mtDNA-Anteils mit dem Alter nachweisbar. $r=0,238$; $p=0,229$; $n=21$.

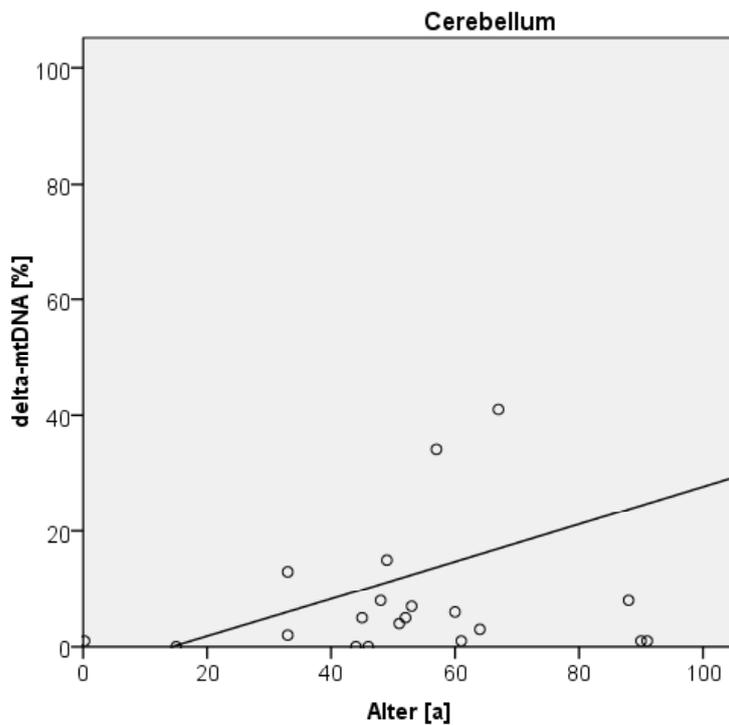


Abbildung 4.10:
 Δ mtDNA-Anteile im Cerebellum. Es wurden je 25 Neurone von 20 Personen in einem Reaktionsgefäß gesammelt und untersucht. Es ist kein signifikanter Anstieg des Δ mtDNA-Anteils mit dem Alter nachweisbar. $r=0,156$; $p=0,512$; $n=20$.

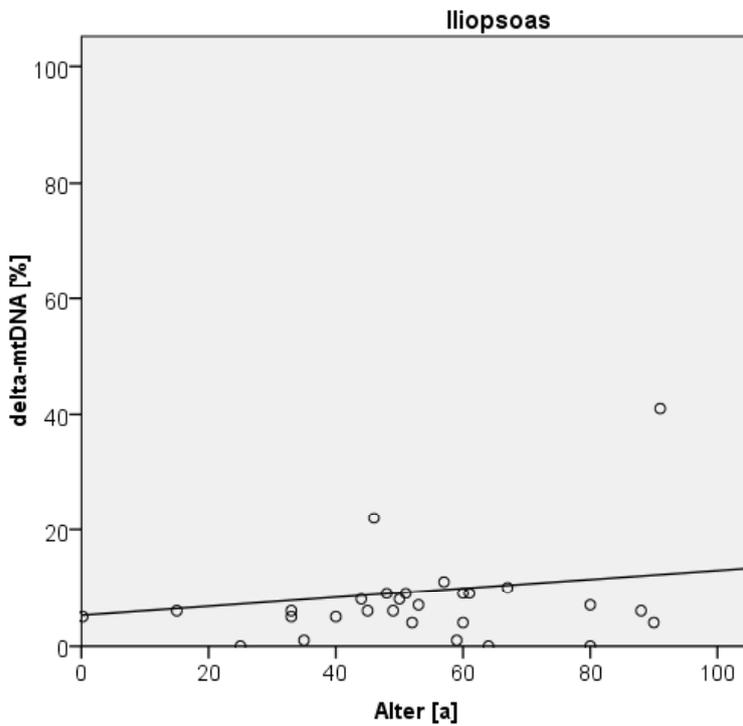


Abbildung 4.11:
 Δ mtDNA-Anteile im
M.iliopsoas. Es wurde
 Homogenat von $n= 28$
 Personen untersucht.
 Es ist kein signifikanter
 Anstieg des Δ mtDNA-
 Anteils mit dem Alter
 nachweisbar. $r=0,29$;
 $p=0,153$; $n=28$.

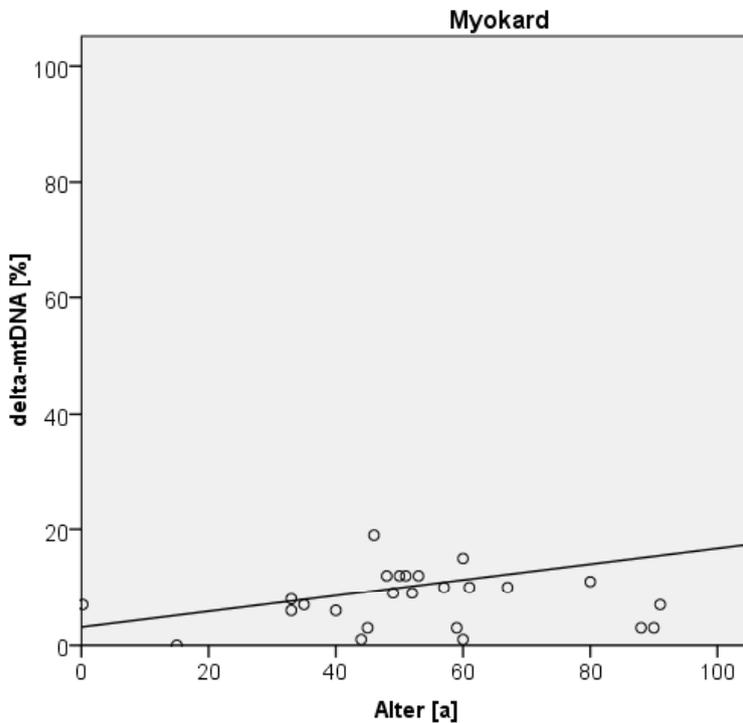


Abbildung 4.12:
 Δ mtDNA-Anteile im Myo-
 kard. Es wurde Homo-
 genat von 25 Personen
 untersucht. Es ist kein
 signifikanter Anstieg des
 Δ mtDNA-Anteils mit dem
 Alter nachweisbar.
 $r=0,052$; $p=0,807$; $n=25$.

Aus histologischen Präparaten äußerer Augenmuskulatur wurden phänotypisch unauffällige Muskelzellen isoliert. Dieses Vorgehen wurde der Homogenisierung vorgezogen um trotz des höheren Anteils COX-defizienter Zellen in der Augenmuskulatur eine vergleichbare, phänotypisch unauffällige Zellpopulation zu erhalten.

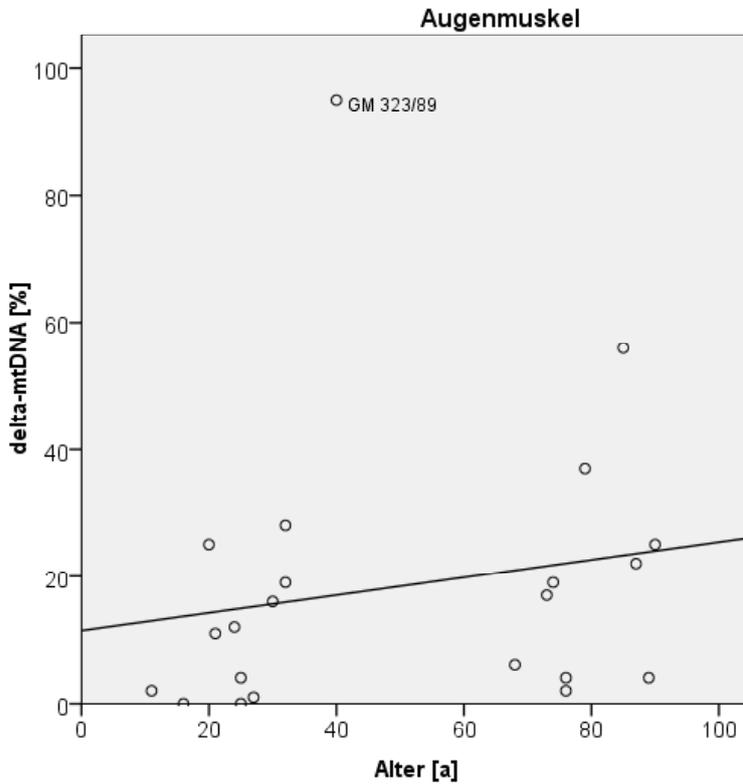


Abbildung 4.13: Δ mtDNA-Anteile in Augenmuskeln. Es wurden je 10 Augenmuskelzellen von Personen gesammelt und untersucht. Es ist kein signifikanter Anstieg des Δ mtDNA mit dem Alter nachweisbar. $r=0,181$; $p=0,419$; $n=22$.

4.2.2 Vergleich des Δ mtDNA-Anteils in verschiedenen Geweben

Es wurden die Δ mtDNA-Anteile der untersuchten Gewebe (Cortex cerebri, Cerebellum, M. Iliopsoas, Myokard, äußere Augenmuskulatur) verglichen. Dabei wurde jeweils der Mittelwert aller untersuchten Proben gebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 und Abbildung 4.14. dargestellt.

Gewebe	MW	SD	n
Cortex cerebri	7,7	8,5	21
Cerebellum	7,8	11,1	20
M. Iliopsoas	7,5	7,9	28
Myokard	7,8	4,7	25
Augenmuskel	18,4	22,1	22

Tabelle 4.1: Δ mtDNA-Anteile der untersuchten Gewebe. In der Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen ($p=0,01$). n bezieht sich auf die Anzahl der untersuchten Personen

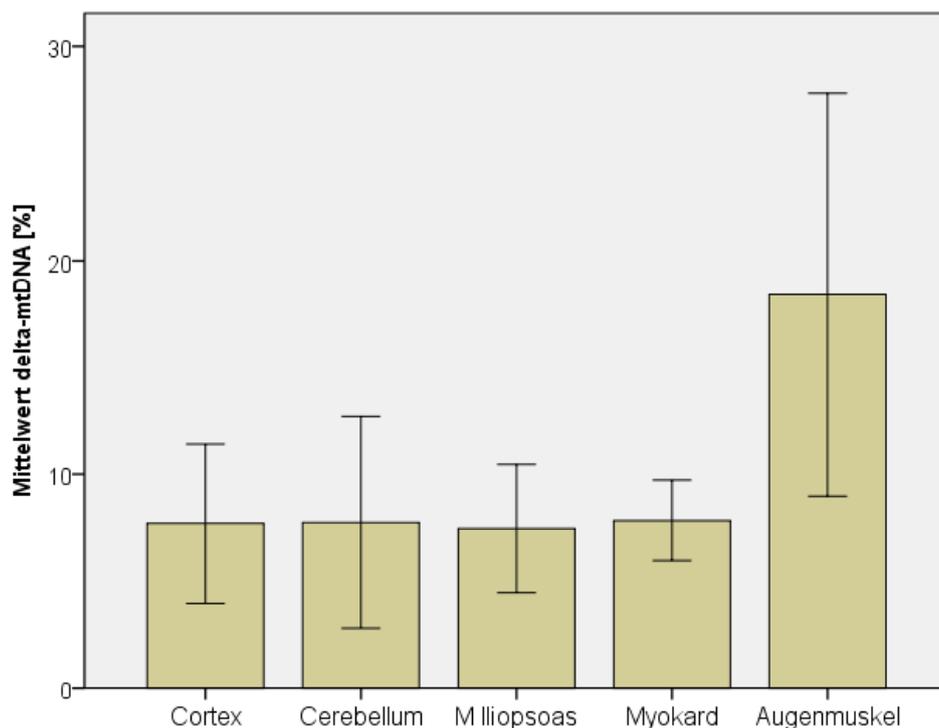


Abbildung 4.14: Mittelwerte der Δ mtDNA-Anteile der untersuchten Gewebe. Die Fehlerbalken entsprechen dem 95% Konfidenzintervall.

Es zeigt sich im Vergleich von Skelett- und Augenmuskulatur ein signifikant höherer Δ mtDNA-Anteil in Augenmuskeln ($p=0,046$). Im Vergleich der Augen- mit Herzmuskulatur zeigt sich ein statistischer Trend zu höheren Δ mtDNA-Anteilen in Augenmuskeln ($p=0,069$). Im Vergleich der Augenmuskulatur mit neuronalen Geweben zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Cortex $p=0,085$, Cerebellum $p=0,095$).

Es wurde auf eine homogene Altersverteilung in den untersuchten Gruppen geachtet (Mittelwert \pm Standardabweichung des Alters: Cortex cerebri 52 \pm 20 Jahre, Cerebellum 52 \pm 23 Jahre, M. Iliopsoas 53 \pm 22 Jahre, Myokard 52 \pm 21 Jahre, Augenmuskel 50 \pm 29 Jahre). Der Altersunterschied war nicht signifikant ($p=0,995$).

4.3 Alters- und Gewebeabhängige Unterschiede der mtDNA-Kopienzahlen

4.3.1 mtDNA-Kopienzahlen mit zunehmendem Alter

Es wurden die Anzahl an Kopien der mtDNA pro Zelle in Neuronen des Cortex cerebri und des Cerebellums bestimmt. In Abbildung 4.15 werden altersabhän-

gige Veränderungen dargestellt. Im M. Iliopsoas und im Myokard wurde homogenisiertes Gewebe untersucht. Hier konnte nur eine relative Einheit erhoben werden („relative Häufigkeit“). In Abbildung 4.16 werden altersabhängige Veränderungen in diesen Geweben dargestellt.

Bei Gewebeproben der äußeren Augenmuskulatur wurden wie in neuronalen Geweben die Kopienzahlen einzelner Neurone bestimmt. Angesichts der höheren Zahl COX-defizienter Muskelzellen wurden COX-normale und COX-defiziente Muskelzellen getrennt untersucht. Die altersabhängigen Veränderungen sind in den Abbildungen 4.17 und 4.18 dargestellt.

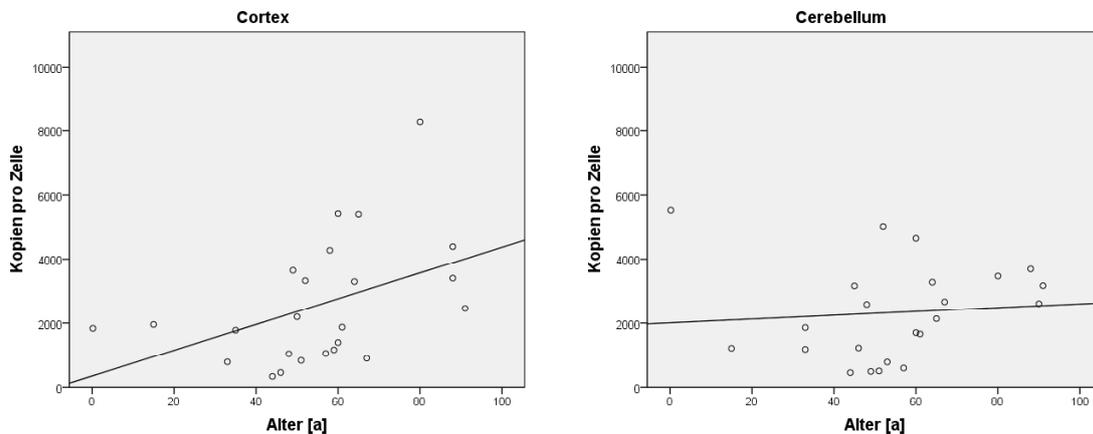


Abbildung 4.15: Kopienzahl der mtDNA pro Neuron in Cortex cerebri und Cerebellum. Es zeigt sich ein signifikanter altersabhängiger Anstieg der Kopienzahl in Neuronen des Cortex cerebri Neuronen ($r=0,238$; $p=0,032$; $n=24$) aber nicht in Neuronen des Cerebellums ($r=0,087$; $p=0,693$; $n=23$).

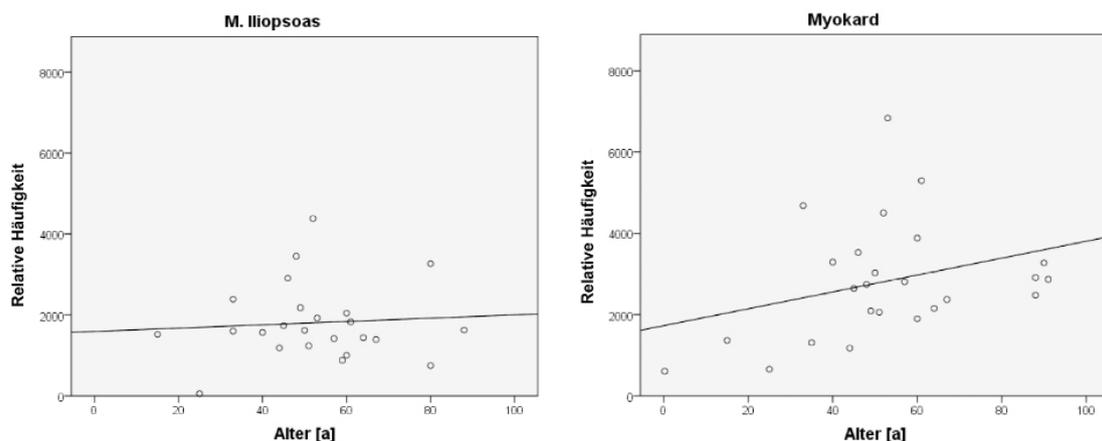


Abbildung 4.16: Relative Häufigkeit der mtDNA in M. Iliopsoas und Myokard. In beiden Gewebe zeigte sich keine signifikante Veränderung der Kopienzahl mit zunehmendem Lebensalter (M. Iliopsoas: $r=0,074$; $p=0,731$; $n=24$, Myokard: $r=0,32$; $p=0,119$; $n=25$).

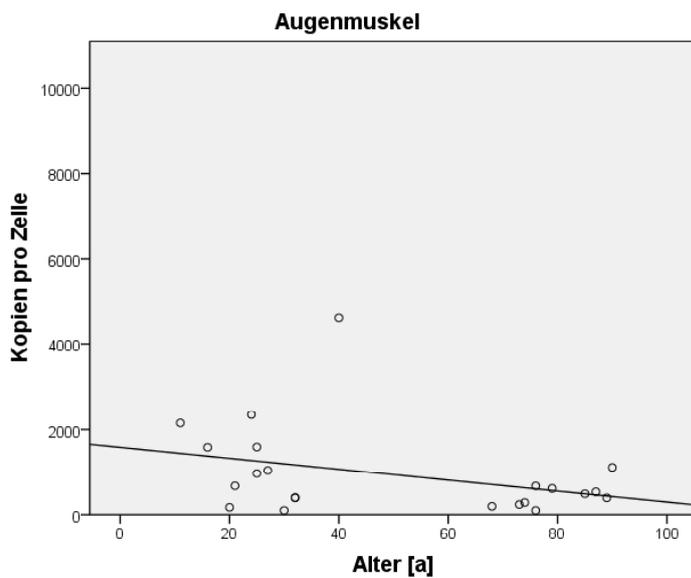


Abbildung 4.17:
Kopienzahl der mtDNA in phänotypisch unauffälligen COX-normalen äußeren Augenmuskelzellen. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Kopienzahl mit zunehmendem Lebensalter ($r=-0,309$; $p=0,162$; $n=22$).

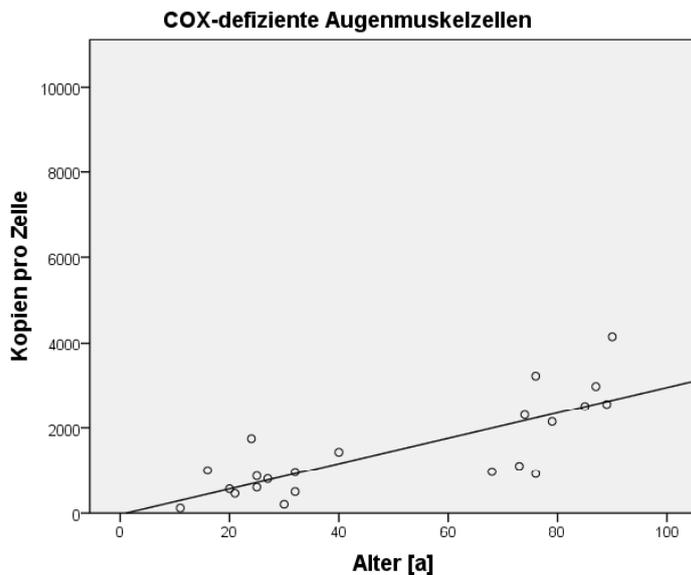


Abbildung 4.18:
Kopienzahl der mtDNA in COX-defizienten äußeren Augenmuskelzellen. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Kopienzahl mit zunehmendem Lebensalter ($r=0,787$; $p<0,01$; $n=22$).

4.3.2 mtDNA-Kopienzahlen in unterschiedlichen Geweben

Es wurden die Mittelwerte der Kopienzahlen mitochondrialer Genome der verschiedenen Gewebe berechnet. In Cortex cerebri Neuronen konnten im Mittel 2563 ± 1944 ($n=24$) Kopien und in Neuronen des Cerebellums 2330 ± 1494 ($n=23$) Kopien der mtDNA nachgewiesen werden ($p=0,648$). In phänotypisch unauffälligen Augenmuskelzellen wurden 940 ± 1042 ($n=22$) Kopien gefunden. Im Vergleich der Kopienzahlen der phänotypisch unauffälligen Einzelzellen (aus Cortex cerebri, Cerebellum und Augenmuskulatur, siehe Abb. 4.19) zeigte sich ein

statistisch signifikanter Unterschied zwischen der höheren Kopienzahl in Cortex cerebri und Cerebellum und der niedrigeren Kopienzahl in der Augenmuskulatur (ANOVA $p=0,001$, Post-Hoc-Scheffé Cortex: $p=0,03$, Cerebellum: $p=0,014$).

Im Vergleich der mtDNA-Kopienzahlen COX-normaler und COX-defizienter Augenmuskelzellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (COX-normale Zellen zeigten im Mittel 940 ± 1042 Kopien; $n=22$; COX-defiziente Zellen 1460 ± 1090 Kopien; $n=22$; $p=0,113$).

Die relative Häufigkeit der mtDNA des M. iliopsoas (1807 ± 941 ; $n=24$) ist signifikant niedriger als die des Myokards (2818 ± 1445 ; $n=25$; $p=0,006$, siehe Abb. 4.20).

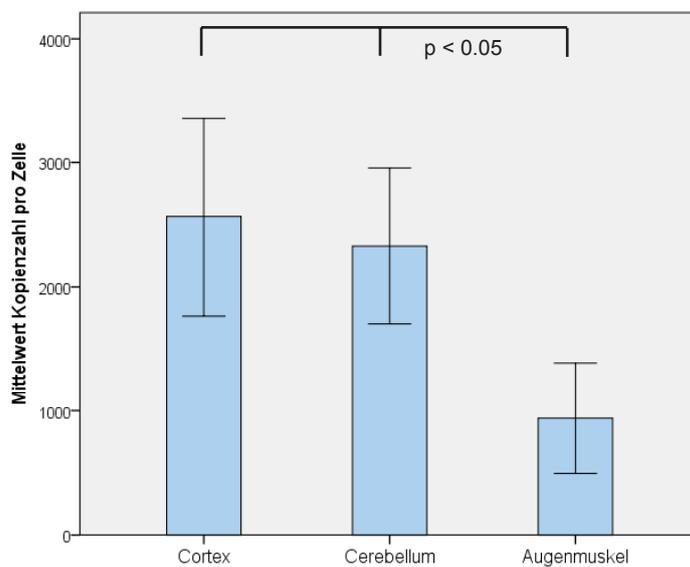


Abbildung 4.19: Mittelwerte der Kopienzahlen der mtDNA in verschiedenen untersuchten Geweben. Es werden die Ergebnisse phänotypisch unauffälliger Zellen dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen 95% Konfidenzintervallen.

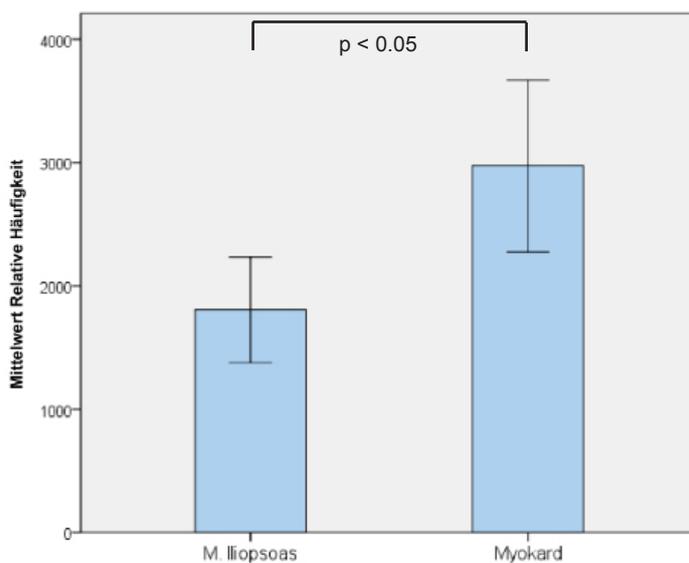


Abbildung 4.20: Mittelwerte der relativen Häufigkeit der mtDNA in M. iliopsoas und Myokard. Die Fehlerbalken entsprechen 95% Konfidenzintervallen.

5. Diskussion

5.1 Deletionen der mtDNA und Funktionsstörungen der Atmungskette

5.1.1 COX-Defizienz im Alterungsprozess

Funktionsstörungen der Atmungskette sind wahrscheinlich am Alterungsprozess beteiligt. So zeigten histochemische Untersuchungen alternder Gewebe eine altersabhängig zunehmende Häufung COX-defizienter Zellen in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers, z.B. in verschiedenen Skelettmuskeln [97, 100, 101, 102], externe Augenmuskeln [102, 104], im Herzmuskel [91], in Zellen des Plexus choroideus, in den Neuronen des Hippocampus [105] oder der Substantia nigra [106]. Eine in dieser Arbeit durchgeführte Zählung COX-defizienter Zellen in Herzmuskel und Skelettmuskel zeigte eine altersassoziierte Zunahme, die gut mit den vorangestellten Studien vereinbar ist.

Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen COX-Defizienz und Deletionen der mtDNA hergestellt werden. COX-defiziente Myozyten zeigten einen durchschnittlicher Δ mtDNA-Anteil von 75% (SD \pm 23), COX-normale Zellen ein Anteil von 23% (SD \pm 19). COX-defiziente Zellen zeigten also einen signifikant ($p < 0,01$) höheren Δ mtDNA-Anteil als die vergleichbaren phänotypisch unauffälligen Zellen. Der Δ mtDNA-Anteil der COX-defizienten Zellen ist auch in 77% der Fälle ($n=22$) höher als 60%, einer Schwelle, die in diesem Bereich auch für Funktionsstörungen der Atmungskette bei mitochondrialen Erkrankungen [64, 107, 108, 109] und *in vitro* [110, 111] gefunden wurde. Die Ergebnisse sind somit plausibel. Die hier erhobenen Ergebnisse implizieren, dass Deletionen für die histochemisch detektierten Dysfunktion der Atmungskette verantwortlich sind. Dieser Zusammenhang wurde auch in anderen Arbeiten gefunden [109, 112].

Es wurden auch in Zellen, die sich in der COX-SDH Färbung unauffällig darstellten Deletionen der mtDNA gefunden, wenn auch auf niedrigerem Niveau (Δ mtDNA-Anteil von 23%). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass in allen Muskelfasern altersassoziiert Deletionen der mtDNA entstehen, diese aber erst ab Überschreiten einer Schwelle zu einer phänotypischen Demaskierung führen. Dazu passend fand man bei multiplen Deletionen der ad-CPEO und in verschiedenen COX-defizienten Zellen gealterter Menschen unterschiedliche Deletionen der mtDNA [70, 97, 101]. Eine Erklärung dafür bietet die Hypothese

der klonalen Expansion. So könnte eine zufällig entstandene Deletion der mtDNA klonal in jeder Muskelfaser bis zum Erreichen einer hohen Deletionslast expandieren. Um in dieser Hinsicht die Deletionen qualitativ zu unterscheiden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Long-nested PCR mit den schon in der Realtime-PCR untersuchten Proben durchgeführt (Abb. 4.6 und 4.7). 11 der 12 untersuchten COX-negativen Einzelzellen zeigten jeweils ein verkürztes mtDNA Fragment entsprechend einer bestimmten Deletion. Gepoolte COX-normale Zellen zeigten nur wild-Typ Banden, entsprechend des von den Primern flankierten Bereichs. Bei gepoolten COX-negativen Zellen zeigen sich mehrere verkürzte Banden in jeder Bahn, vermutlich entsprechend der Anzahl der gesammelten Zellen. Es ist also anzunehmen, dass in jeder Zelle meistens nur eine spezifische Deletion für die Funktionsstörung der Atmungskette verantwortlich ist. In verschiedenen Zellen würden so verschiedene Deletionen zu Funktionsstörungen führen. Multiple Deletionen würden bei Untersuchung eines Gewebes im Ganzen und eine spezifische singuläre Deletion würde bei Untersuchung einzelner Zellen gefunden werden. Eine zufällige Entstehung einer Deletion in einer Zelle, und die anschließende klonale Expansion zu hohen Funktions-relevanten Anteilen dieser Deletion an der mtDNA, ist also, bei den hier untersuchten altersassoziiert funktionsgestörten Zellen, plausibel. Die klonale Expansion einer Deletion könnte mit einem Replikationsvorteil des kürzeren Teilstücks gegenüber der längeren wt-mtDNA erklärt werden [69].

Bei allen voranstehenden Arbeiten, inklusive der eigenen Untersuchung, ist allerdings der Anteil der COX-defizienten Zellen an den Zellen eines Gewebes eher niedrig, so dass sich die Frage stellt, ob dieser Anteil auf die Funktion eines Gewebes oder Organs überhaupt Auswirkungen haben kann. Eine neuere Untersuchung zeigt, dass schon Deletionsanteile ab 30% Auswirkungen auf grundlegende bioenergetische Parameter haben [113], obwohl eine andere Untersuchungen eine solche Beeinträchtigung erst ab 50-55% nachwies [114]. Nach den Ergebnissen der eigenen Arbeit beginnt die histochemisch detektierbare COX-Defizienz bei einem Δ mtDNA-Anteil von etwa 60%, aber auch niedrigere Anteile wurden in COX-defizienten Zellen gefunden. Obwohl der genaue Mechanismus der Funktionsstörungen noch unklar ist, könnte man annehmen, dass auch niedrige Deletionslasten die zelluläre Funktion beeinträchtigen und erst höhere Deletionslasten zu den durch Färbungen auffälligen COX-negativen Zellen führen [97]. Die histochemisch oder immunhistochemisch detektierbaren Auswirkungen könnten also die „Spitze des Eisbergs“ der Zellfunktionsstörung sein, und Deletionen der mtDNA, trotz der geringen Zahl COX-negativer Zellen, zu einer

altersabhängigen Beeinträchtigungen der Funktion eines Gewebes oder Organs führen. Ein anderes Erklärungsmodell für den niedrigen Anteil COX-defizienter Zellen in einem Gewebe bietet die Möglichkeit, dass Zellen, die schwere Störungen der Atmungsketten-Funktion zeigen, rasch apoptotisch oder nekrotisch degradieren und abgeräumt werden. Ein Vorgang, der beispielsweise als Modell für die Entstehung der Sarkopenie dient [115]. Zuletzt wäre auch die Möglichkeit denkbar, dass auch eine geringe Anzahl phänotypisch auffälliger Zellen die Funktion eines Gewebes beeinträchtigt. Ein Erklärungsmodell, dass gerade bei den stark vernetzten Zellverbänden neuronalen Gewebes, sehr plausibel erscheint.

5.1.2 Deletionen der mtDNA im Alterungsprozess

Die vorliegende Untersuchung der Deletionen der mtDNA soll nicht auf histochemisch phänotypisch auffällige Zellen beschränkt sein, sondern die Zellen eines Gewebes möglichst gleichmäßig und zufällig abbilden. So wurde die Δ mtDNA in phänotypisch unauffälligen Zellen verschiedener Gewebe von Personen unterschiedlichen Alters untersucht. Im Herz- und Skelettmuskel wurde die Untersuchung an Homogenat durchgeführt, da hier die Anzahl unauffälliger Muskelzellen die COX-defizienten Zellen um ein Vielfaches übersteigt. So sollten die gemessenen Δ mtDNA-Anteile phänotypisch unauffälligen Zellen entsprechen.

Unabhängig von den möglichen funktionellen Auswirkungen der Deletionen sollte hier zunächst der zuverlässige Nachweis einer Akkumulation von Δ mtDNA mit dem Alter erbracht werden. Danach könnten in weiteren Arbeiten Fragen der Bedeutung und Pathophysiologie der Deletionen im Alterungsprozess angegangen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Δ mtDNA-Anteil in verschiedenen, post-mortem entnommenen, Geweben von Personen aus unterschiedlichen Altersgruppen (2 Monate bis 91 Jahre) quantifiziert. Die Akkumulation von Δ mtDNA sollte vor allem in post-mitotischem Gewebe mit hoch aktivem oxidativen Stoffwechsel zu Störungen führen. Die Quantifizierung wurde deshalb in den Geweben Skelettmuskel, Herzmuskel und Gehirn durchgeführt. Keiner der Ansätze zeigte eine signifikante Zunahme des Δ mtDNA-Anteils mit dem Alter. Den Nachweis einer altersabhängigen Akkumulation von Δ mtDNA konnte diese Arbeit somit nicht erbringen. Diese für diese Gewebe erstmals nachgewiesene ausbleibende Akkumulation lässt eine relevante Bedeutung von Deletionen der mtDNA im Alterungsprozess zunächst unwahrscheinlich erscheinen. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse im Kontext der mitochondrialen Theorie des Alterns betrachtet werden.

Bei der Untersuchung der Skelett- und Herzmuskulatur wurde Homogenat verwendet. Dank des homogenen Zellmusters von Muskelgewebe, sollte sich so eine Akkumulation von Deletionen der mtDNA auch auf diese Weise zeigen. Aber ein Gewebe kann homogen, d.h. nur aus einer Zellart aufgebaut, sein, aber trotzdem sehr heterogen in Bezug auf die Qualität und Quantität der Deletionen sein. Bei einer Untersuchung von Kardiomyozyten, die Menschen verschiedenen Alters entnommen wurden, fand man singuläre Deletionen in 11% bis 64% der mtDNA Moleküle einer einzelnen Zelle [116]. Dabei zeigte jede Zelle eine spezifische Deletion und unterschiedliche Zellen unterschiedliche Deletionen, was auch in den eigenen Ergebnissen bestätigt werden konnte. Im Gewebe zeigt sich also ein Mosaikmuster aus Zellen mit keinen, wenigen und vielen Deletionen nebeneinander. Untersucht man eine große Anzahl Zellen aus so einem Gewebe, wie das im Homogenat der Fall ist, so könnte eine schwächer ausgeprägte oder auf wenige Zellen beschränkte Zunahme des Anteils der mtDNA mit Deletionen durch die große Zahl verschleiert werden. Ein niedriger gemessener Δ mtDNA-Anteil wäre die Folge.

Ein andere Erklärung für eine ausbleibende Δ mtDNA Akkumulation bietet ein möglicher Umbau des Gewebes. Der Anteil an Zellen mit hohen Δ mtDNA-Anteilen könnte niedrig sein weil betroffene Zellen durch Apoptose degradieren und abgeräumt werden. Die überlebenden Zellen würden dann niedrigere Δ mtDNA-Anteile zeigen. In Betrachtung des gesamten Zellverbands würden ebenfalls nur niedrige Anteile gemessen, eine Akkumulation nicht nachgewiesen werden. Dazu passend wurden in Tierversuchen eine mit Altern assoziierte Triggerung des mitochondrialen Apoptose Signalwegswegs [117] und eine Erhöhung des Apoptose-Markers Caspase-3 [73] gezeigt.

Aber ein Mosaikmuster aus unterschiedlich hohen Deletionslasten könnte auch in der Untersuchung von wenigen, lasermikrodissizierten, Zellen den Nachweis einer Δ mtDNA Akkumulation erschweren. Bei der Auswahl einer phänotypisch unauffälligen Zelle aus dem Zellverband, ist es vom Zufall abhängig, wie hoch der Δ mtDNA-Anteil in dieser Zelle ist. Bei einem jungen Menschen könnte man also zufällig eine Zelle mit höherem Δ mtDNA-Anteil finden während man bei einem alten Menschen eine Zelle mit niedrigem Δ mtDNA-Anteil herausnimmt. In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten sich hohe Δ mtDNA-Anteile regelmäßig bei Myozyten, die eben nicht zufällig aus dem Zellverband herausgetrennt wurden, sondern die sich durch einen histochemisch beurteilbaren Phänotyp (COX-Defizienz) auszeichneten. Bei Homogenat und den neuronalen Geweben wurden unauffällige Zellen zufällig ausgewählt. Allerdings sollte für eine Relevanz

des Befundes die Wahrscheinlichkeit eines höheren Δ mtDNA-Anteils eigentlich beträchtlich altersabhängig ansteigen. Es bleibt fraglich, ob die Ergebnisse durch diese Vorstellung erklärt werden können.

Die Annahme eines Ausbleibens einer Akkumulation von Δ mtDNA in den untersuchten Geweben muss neue Perspektiven in der mitochondrialen Theorie des Alterns zur Folge haben. Denn neben Unterschieden in der Verteilung von Δ mtDNA in verschiedenen Zellen eines Gewebes scheinen auch große Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben zu bestehen. Eine Akkumulation von Δ mtDNA im Alterungsprozess wurde in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra nachgewiesen [66, 67]. Ein solcher Akkumulation zeigte sich nicht in hippocampalen Neuronen [67]. Neuronen der Substantia nigra zeigten im Vergleich zu Neuronen des Putamens oder des frontalen Cortex höhere Δ mtDNA-Anteile [97]. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ebenfalls eine ausbleibende Akkumulation in kortikalen Neuronen und erstmals nachgewiesen auch in cerebellären Neuronen und Muskelgeweben. In dopaminergen Neuronen der Substantia nigra scheinen also besondere Belastungen der mtDNA zu bestehen. Diese Neurone sind möglicherweise besonders hohem oxidativem Stress ausgesetzt [119], der die Akkumulation von Schäden der mtDNA verstärkt. Zusätzlich oder alternativ könnten Störungen des Replikationsvorgangs der mtDNA besonders die Neuronen der Substantia nigra betreffen. So zeigen Personen mit Mutationen der mitochondrialen Polymerase Polg γ nigralen Zellverlust und Symptome der Parkinson Erkrankung [120]. Im Alterungsprozess scheint eine Akkumulation von Δ mtDNA nur in bestimmten Gewebe und Zellen stattzufinden, oder in bestimmten Gewebe und Zellen besonders stark ausgeprägt zu sein.

Der Nachweis einer Akkumulation von Δ mtDNA führt zur Frage der Kausalität im Alterungsprozess. Die Deletionen der mtDNA könnten nicht Ursache sondern Folge oder bedeutungsloser Nebeneffekt des Alterungsprozess entsprechen. Neuere Untersuchungen lieferten mit Hilfe von transgenen Maus-Modellen Hinweise für eine mögliche kausale Beziehung zwischen Mutationen der mtDNA und dem Alterungsprozess. Trifunovic et al entwickelten eine PolyA-defiziente Mutator knock-in Maus, die vorzeitiges Altern zeigt [121]. Bei diesen transgenen Mäusen, ist die für das Korrektur-lesen („proof-reading“) zuständige Untereinheit der Polymerase Gamma (PolyA) ausgeschaltet. Die Aktivität der DNA-Polymerase ist unbeeinträchtigt. Die Mäuse zeigen den Phänotyp vorzeitigen Alterns, mit einer Vielzahl an Symptomen wie Haarverlust, Taubheit, Kachexie, Verlust an Knochenmasse, Sarkopenie und eine verkürzte Lebenszeit. Gleichzeitig findet man bei den Mutator-Mäusen hohe Level an Punktmutationen und Deletionen. Die

erhöhte Fehler-Häufigkeit bei der Replikation der mtDNA führt zu erhöhter Mutationsfrequenz. Die hohe Mutationslast führt zum Phänotyp des vorzeitigen Alterns. In einer neueren Arbeit wurden besonders Deletionen der mtDNA als treibende Kraft des vorzeitigen Alterns nachgewiesen [65]. Dieser Zusammenhang spricht für eine kausale Beziehung zwischen Altern und Deletionen der mtDNA.

5.1.3 Gewebeunterschiede und mitochondriale Proliferation

Die in dieser Arbeit gefundenen Häufigkeiten COX-defizienter Zellen in Skelettmuskulatur und Myokard älterer Personen sind sehr gut mit früheren Arbeiten vereinbar. Selbst in höheren Lebensaltern zeigte nur ein kleiner Anteil (bis zu maximal 1%) der Zellen COX-Defizienz [100]. In Herzmuskel von über-50jährigen, und in Glieder- und Zwerchfellmuskulatur von über-70jährigen, wurden im Durchschnitt etwa 0,5 COX-defiziente Zellen pro mm² gefunden [91, 102]. Es wurde dort eine signifikante Zunahme der Häufigkeit COX-defizienter Zellen mit dem Lebensalter festgestellt. Diese Ergebnisse sind sehr gut mit der hier ermittelten Häufigkeit von 0,53 COX-defizienten Zellen pro mm² im M. iliopsoas vereinbar. Es zeigte sich in den vorangestellten Arbeiten, wie in der vorliegenden Arbeit, kein signifikanter Unterschied zwischen Myokard und Skelettmuskulatur. Allerdings wurde im Myokard ein früherer Anstieg der Häufigkeit gezeigt, der wiederum gut zu dem hier gefundenem statistischen Trend der etwas höheren Häufigkeit COX-defizienter Zellen im Myokard (1,19 vs. 0,53 COX-defiziente Zellen pro mm², p=0,089) passt. Die Δ mtDNA-Anteile der untersuchten Proben des M. iliopsoas und des Myokards unterscheiden sich nicht. Allerdings wurde eine relativ höhere mtDNA Menge in den Proben des Myokards gemessen, möglicherweise ein Ausdruck der kontinuierlichen Muskelarbeit in diesem Gewebe.

In externer Augenmuskulatur sind häufiger COX-defiziente Zellen zu finden als in anderer Muskulatur. Ein Vergleich der Häufigkeit COX-defizienter Zellen in Augenmuskulatur mit Skelett- und Herzmuskulatur zeigt, hier wie in vorangegangenen Arbeiten, konstant eine höhere Defekt-Dichte in der Augenmuskulatur [91, 102, 103, 112]. Die äußere Augenmuskulatur scheint eine besondere Vulnerabilität für Deletionen der mtDNA aufzuweisen, so führen durch mtDNA Deletionen bedingte Erkrankungen wie die CPEO oder KSS früh zu Paresen in diesen Muskeln. Die äußere Augenmuskulatur zeigt dabei eine Häufung COX-defizienter Myozyten [109]. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings eine etwa fünffach höhere Häufigkeit COX-defizienter Augenmuskelzellen als in vorangegangenen Arbeiten gefunden [103, 112]. In letztgenannten Arbeiten wurde in höheren Le-

bensaltern eine Häufigkeit von 3-4 COX-defizienten Zellen pro mm² gefunden, die der hier gefundenen Häufigkeit von etwa 20 COX-defizienten Zellen pro mm² gegenübersteht. Der Grund für diese Abweichung ist unklar.

Schon phänotypisch unauffällige Augenmuskelzellen scheinen mehr Deletionen der mtDNA als Zellen anderer Gewebe zu enthalten. Insbesondere enthalten Augenmuskelzellen mehr Deletionen als andere Skelettmuskelzellen. In den untersuchten Augenmuskelzellen ist ebenfalls kein altersassoziierter Anstieg des Δ mtDNA-Anteils nachweisbar, obwohl die mit mtDNA Deletionen assoziierten COX-defizienten Zellen in diesem Gewebe altersabhängig zunehmen. Die Untersuchung der mtDNA-Kopienzahl zeigte in Augenmuskelzellen weniger mtDNA als in anderen Geweben. Man könnte daraus folgern, dass bei einer geringeren mtDNA Menge in äußerer Augenmuskulatur Deletionen rascher expandieren und zu funktioneller Beeinträchtigung führen. Dadurch bedingt sind in Augenmuskulatur mehr COX-defiziente Zellen zu finden. Im Vergleich der Mittelwerte der Kopienzahlen COX-defizienter mit COX normalen Augenmuskelzellen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Aber es konnte gezeigt werden, dass in COX-defizienten Augenmuskelzellen die Kopienzahl mit zunehmendem Lebensalter ansteigt. Dieser Anstieg ist in COX-normalen Augenmuskelzellen nicht nachweisbar. Hier könnte das längere Überleben einer COX-defizienten Zelle mit mehr mtDNA als Erklärung dienen, ein Phänomen, das in höheren Lebensaltern möglicherweise stärker ausgeprägt ist.

Ein anderes Erklärungsmodell wäre eine auf mitochondriale Schäden folgende reaktive Steigerung der mitochondrialen Proliferation. Der Ausgleich drohender Funktionsverluste durch eine erhöhte Replikation der mtDNA würde auch eine die altersabhängig erhöhten mtDNA-Kopienzahl kortikaler Neurone erklären. Die erhöhte Kopienzahl könnte sowohl phänotypischer COX-Defizienz als auch einem erhöhten messbaren Δ mtDNA-Anteil entgegenwirken. Unklar ist dabei aber, warum in cerebellären Neuronen und Muskelgeweben kein altersabhängiger Anstieg der Kopienzahl signifikant nachweisbar ist. Möglicherweise findet in cerebellären Neuronen weniger Schädigung der mtDNA statt. Bei Skelettmuskulatur könnte die ausbleibende Steigerung der mitochondrialen Biogenese Grund für den altersassozierten Zellverlust (Sarkopenie) sein. Muskelzellen mit einer hohen Deletionslast würden rasch degradieren und entfernt werden.

5.1.4 Besonderheiten der äußeren Augenmuskulatur

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit sind die konstant nachweisbaren

Unterschiede zwischen äußerer Augenmuskulatur und anderen Muskelgeweben. Die äußere Augenmuskulatur zeigte, wie in vorangegangenen Arbeiten beschrieben [91, 102, 103, 112], eine höhere Defektdichte des mitochondrialen Stoffwechsels und der mtDNA. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Akkumulation von Δ mtDNA in den COX-defizienten Augenmuskelzellen auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte erstmals die klonale Expansion einer spezifischen Mutation als Entstehungsmodell der Δ mtDNA Akkumulation nachgewiesen werden. Die besondere Betroffenheit der Augenmuskelzellen spricht für biologische Unterschiede zwischen der äußeren Augenmuskulatur und anderen Geweben, insbesondere anderen Muskelgeweben. Grundlegend zeichnet sich die äußere Augenmuskulatur durch eine andere Faser-Typ-Zusammensetzung mit unterschiedlicher Organisation der motorischen Einheit aus [122, 123]. Im Vergleich zur Skelettmuskulatur wurde bei morphometrischer Beurteilung auch ein höherer Mitochondriengehalt gesehen [124]. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der hier erhobenen Verminderung der mtDNA. Der erhöhte Mitochondriengehalt wurde in plausiblen Zusammenhang mit einer erhöhten muskulären Beanspruchung der Augenmuskulatur gesetzt. Die äußere Augenmuskulatur soll länger Kontraktionen aufrecht erhalten und erhöhte Widerstandskraft gegen Erschöpfung haben [125]. Allerdings ist beispielsweise das Myokard weit größeren kontinuierlich andauernden Belastungen ausgesetzt, passend zeigte sich dort in der vorliegenden Arbeit ein höherer mtDNA Gehalt. Eine weitere Besonderheit zeichnet die Augenmuskulatur aus. Im Tiermodell und in humaner äußerer Augenmuskulatur zeigte sich eine kontinuierliche Umwandlung von Satellitenzellen in Muskelzellen [126]. Passend dazu fand man Hinweise auf eine gesteigerte Apoptose [127]. So könnte der kontinuierliche Ersatz apoptotischer COX-defizienter Zellen altersabhängigen Funktionsstörungen des Muskelgewebes entgegenwirken. So bliebe die Funktion der Muskulatur trotz einer hohen mitochondrialen Defektdichte erhalten.

5.2 Einordnung der verwendeten Methoden

Frühere Untersuchungen von COX-defizienten Zellen in Geweben älterer Personen konnten nur wenig Δ mtDNA nachweisen. Diese Ergebnisse könnten Ausdruck methodischer Beschränkungen sein. So fand man bei der Untersuchung spezifischer Deletionen, beispielsweise der 4977bp langen „common deletion“, nur sehr wenige mtDNA Moleküle mit diesen Deletionen in COX-defizienten Zellen altern-

der Gewebe [104, 128]. Dies erscheint besonders auffällig angesichts der hohen mtDNA-Anteile mit einer spezifischen Deletion bei mitochondrialen Myopathien und der Feststellung, dass die funktionelle Rezessivität des mitochondrialen Genoms Beinrchtigungen wohl erst ab einer Schwelle des Δ mtDNA-Anteils von etwa 60-80% erlaubt [64, 107, 108, 111, 112, 114, 129, 130, 131]. Erst Ergebnisse, die nachwiesen, dass die altersassoziierten Mutationen eine große Bandbreite zeigen und ihrer stochastischen Natur entsprechend über große Abschnitte der mtDNA verteilt sind, brachten die Möglichkeit funktioneller Auswirkungen von Deletionen der mtDNA wieder ins Spiel [97, 101, 132]. Es kann also entscheidend sein, nicht nur eine spezifische, sondern möglichst alle, über die mtDNA verteilten, Deletionen zu detektieren. Ermöglicht wird das durch den hier verwendete Realtime-PCR Ansatz, der die Häufung von Δ mtDNA in bestimmten Bereichen des Genoms ausnutzt. Bei der Untersuchung des Δ mtDNA-Anteils korrelieren die Ergebnisse der hier verwendeten Realtime PCR Methode sehr gut mit den beiden Methoden Southern Blot und 3-Primer competitive PCR [98]. Zusätzliche Genauigkeit der Ergebnisse konnte durch die Entwicklung einer multiplex Realtime PCR Methode erreicht werden [99]. Ein großer Vorteil der Methode ist die Verbindung einer quantitativen Analyse, wie beim Southern Blot [133], mit der Möglichkeit, geringe DNA Mengen zu analysieren, wie bei verschiedenen PCR Techniken [64, 101, 134, 135]. In der vorliegenden Arbeit konnte so die DNA von lasermikrodissizierten Gewebeproben analysiert werden. Dabei ist die DNA einer einzelnen Zelle ausreichend für die Bestimmung des Δ mtDNA-Anteils. Die Kombination aus einem spezifischen (Lasermikrodissektion) und quantitativen (Realtime PCR) Ansatz ermöglicht es, im Vergleich zu den früheren Untersuchungen, eine genauere Bestimmung der Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen.

5.3 Möglichkeiten einer therapeutischen Nutzung

Zentrale Bedeutung bei der Untersuchung des Alterungsvorgang sollte immer die Möglichkeit therapeutischer Nutzung haben. Denn Ziel der Altersforschung sollte nicht die Ausschaltung des physiologischen Alterungsprozesses sein, sollte nicht die potentielle Verlängerung der Lebenszeit ins Unendliche sein. Vielmehr soll die Behandlung altersabhängiger degenerativer Erkrankung im Zentrum stehen, denn diese treten häufig früh auf und führen zu beträchtlicher Reduktion der Lebensqualität, beispielsweise bei den neurodegenerativen Erkrankungen M. Parkinson oder M. Alzheimer. Die Grenze zwischen den Prozessen, die zum

unausweichlichen Ende des Lebens führen und Krankheiten, die als behandlungsbedürftig gelten, kann nicht fest definiert werden. Wann soll eine Krankheit behandelt oder Anstrengungen zur Therapiefindung unternommen werden und wann sind Krankheiten als Teil des Lebenszyklus zu akzeptieren? Im Falle der o.g. Beispiele würden die teilweise frühen Manifestation und die massive Einschränkung der Lebensqualität bei langer Krankheitsdauer als Argumente für eine Therapiefindung sprechen. So werden im Folgenden einige potentiell therapeutische Ansätze dargestellt. Neben den neurodegenerativen Erkrankungen wird auf die Sarkopenie, die Degeneration der Myozyten, eingegangen. Auch für die Sarkopenie kann als Therapie-würdig angesehen werden, der altersabhängige Kraftverlust zieht eine Vielzahl Verletzungen und Beschränkungen des Alltags nach sich. Mit zunehmenden Funktionsverlust der Mitochondrien sind noch eine Reihe an weiteren Pathologien mit möglichen therapeutischen Strategien, darunter beispielsweise Kardiomyopathien oder Diabetes mellitus, diese sollen aber hier nur erwähnt sein. Neben den alterassozierten degenerativen Erkrankungen sind mitochondrial wirksame Therapien, im Besonderen die Pharmakotherapie, für Mitochondriopathien von zentraler Bedeutung.

5.3.1 Pharmakotherapie und Nahrungsergänzung

Um die Auswirkungen von Δ mtDNA zu mindern, können die ursprüngliche Schädigung verhindert oder die Auswirkungen ausgeglichen werden.

Akzeptiert man die Rolle von oxidativem Stress an der Akkumulation von Δ mtDNA, sind antioxidative Substanzen eine Möglichkeit, die Schädigung der mtDNA zu verhindern. Bekannte Antioxidantien sind z.B. die Vitamine und Provitamine Vitamin C, Vitamin E (α -Tocopherol) und Carotinoide (β -Carotin), das Hormon Melatonin oder die Spurenelemente Kupfer und Selen. Es konnten viele eindeutige Zusammenhänge zwischen Antioxidantien und in vivo Markern für oxidativen Stress hergestellt werden, aber in klinischen Studien wurden keine oder nur geringe Auswirkungen auf den Alterungsprozess gesehen [136].

Eine Steigerung der mitochondrialen Biogenese könnte zu Funktionsverbesserung der Mitochondrien führen. Es würden vermehrt Mitochondrien gebildet, die zur Energiegewinnung bereitstehen, geschädigte Mitochondrien würden rascher abgebaut und ersetzt werden und das Überleben von funktionstüchtigen Mitochondrien würde verlängert werden. Aktivierende Stoffe sind beispielsweise Fibrate und Rosiglitazon, Metformin und AICAR, oder Resveratrol [137]. Insbesondere für Bezafibrat wurde die Verbesserung der OXPHOS in vitro und in

vivo nachgewiesen [138] und in einer Pilotstudie erfolgreich für Störungen der β -Oxidation eingesetzt [139].

Ein Funktionsverlust der Atmungskette führt zu verminderter Bereitstellung von Energie-Äquivalenten, hauptsächlich ATP. Auch darüber kann in den Pathomechanismus eingegriffen werden: Kreatin und Kreatinphosphat sind natürlich vorkommende Stoffe, die essentiell für die ATP-Homöostase sind. Kreatin ist seit langem als Nahrungsergänzungsmittel im Fitness-Sport gebräuchlich. Bei Mäusen wurde eine leichte Verbesserung der Gesundheit und Verlängerung der Lebenszeit mit der Supplementation von Kreatin erreicht [140]. Bei der neurodegenerativen Parkinson-Krankheit wurde ein neuroprotektiver Effekt im Maus-Modell nachgewiesen [141], der allerdings bei betroffenen Menschen nicht erreicht wurde [142]. Der exakte Wirkungsmechanismus von Kreatin und Kreatinphosphat ist bisher nicht verstanden, ebenso die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen bei Nagetieren und Menschen. Eine abschließende Beurteilung ist noch nicht möglich.

5.3.2 Lebensverlängerung durch Kalorienrestriktion

Kalorienrestriktion, bekannter unter der englischsprachigen Bezeichnung „Caloric restriction“, ist bisher die einzige nicht-gentechnische Möglichkeit, die bei Versuchsorganismen wie bestimmten Hefen, Würmern, Fliegen und Nagetieren zu einer Verlängerung der Lebenszeit führt [141], allerdings ist die Analogie bei Primaten und Menschen nicht bestätigt. Zumindest verringert die Restriktion der Kalorienaufnahme bei Säugetieren die Inzidenz altersabhängiger Krankheiten wie Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes [141]. Bei der Kalorienrestriktion wird die Kalorienaufnahme ohne Mangelernährung unter die ad Libitum Aufnahme gesenkt. Der genaue zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist bisher ungeklärt. Man vermutete, dass die Verminderung der Kalorienaufnahme den Stoffwechsel verlangsamt und diese Verlangsamung die ROS Produktion und Schädigung der Zelle vermindern könnte. Wie sich Kalorienrestriktion über einen langen Zeitraum auf den Menschen auswirkt, ist nicht bekannt. Aber metabolische und hormonelle Anpassungen des menschlichen Körpers bei Kalorienrestriktion sind den Ergebnissen bei Nagetieren ähnlich [139]. Ebenso werden oxidative Marker beeinflusst [140].

5.4 Abschließende Bewertung der untersuchten Hypothesen

Die Häufigkeit COX-defizienter Myozyten nimmt mit dem Lebensalter zu, Hypothese (i) konnte in Skelett- und Herzmuskulatur bestätigt werden. Vergleichbare Daten für andere post-mitotische Gewebe, insbesondere neuronale Gewebe, konnten nicht erhoben werden. Obwohl COX-defiziente Myozyten mehr Deletionen tragen als COX-normale (ii), konnte keine altersabhängige Zunahme des Δ mtDNA-Anteils (iv) nachgewiesen werden. Hypothese (ii) konnte also bestätigt, Hypothese (iv) nicht bestätigt werden. Hypothese (iii) konnte bestätigt werden, die hohe Δ mtDNA-Anteile in COX-defizienten Myozyten sind durch jeweils eine somatische Deletion verursacht. Hypothese (vi) konnte ebenfalls bestätigt werden, besonders die äußere Augenmuskulatur unterscheidet sich von den anderen untersuchten Geweben. Hypothese (v), eine reaktive mitochondriale Proliferation, konnte nicht eindeutig bewertet werden. Es konnte eine signifikante altersabhängige Zunahme der mtDNA-Kopienzahl, also eine Steigerung der mitochondrialen Proliferation, in Neuronen des cerebellären Cortex und in COX-defizienten äußeren Augenmuskulaturzellen nachgewiesen werden, nicht aber in COX-normalen Augenmuskulaturzellen, in kortikalen Neuronen und in Skelett- und Herzmuskulatur. Ebenso zeigten COX-defiziente Zellen nicht signifikant höhere Kopienzahlen als COX-normale. Abschließend können diese Ergebnisse als weiteren Anhalt für eine Beteiligung der mtDNA am Alterungsprozess gewertet werden. Deletionen der mtDNA akkumulieren dabei aber nicht linear mit dem Lebensalter, sondern führen möglicherweise schnell zu funktionellen Ausfällen der Atmungskette. Die schwerer betroffenen Zellen werden möglicherweise durch gesteigerte mitochondriale Proliferation oder Dynamik wiederhergestellt oder durch Apoptose aus dem Zellverband ausgesondert, so dass auch in höherem Alter die Funktion des Gewebes erhalten bleibt.

6. Zusammenfassung

Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) entstehen im Alterungsprozess. Möglicherweise akkumulieren sie im Laufe des Lebens und führen zu Funktionsstörungen der oxidativen Phosphorylierung. Die Funktionsstörungen der Atmungskette beeinträchtigen wiederum die Funktion eines Gewebes oder Organs, führen zu altersassoziierten degenerativen Veränderungen.

In dieser Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen hohen Anteilen mutierter mtDNA und Funktionsstörungen der mitochondrial kodierten Cytochrom C Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) hergestellt. Der Anteil an mtDNA mit Deletionen (Δ mtDNA) wurde in einzelnen Muskelzellen quantifiziert. Dabei wurden die histochemisch unterscheidbaren Zellen mit Lasermikrodissektion aus dem Gewebe isoliert und der Anteil der mtDNA Moleküle mit Deletionen mit quantitativer Real-time PCR bestimmt. In phänotypisch auffälligen Augenmuskelzellen (COX-defizient) fanden sich signifikant höhere Deletions-Anteile als in phänotypisch unauffälligen Zellen. Die qualitative Analyse (mit Long-Range nested PCR) der Deletionen dieser Zellen zeigte, dass jede Zelle nur eine spezifische Deletion trägt, vereinbar mit der Hypothese der klonalen Expansion einer singulären Deletion in post-mitotischem Gewebe. Hier besteht also ein Zusammenhang der Deletionen der mtDNA mit Funktionsstörungen der Atmungskette.

Die Funktionsverluste der Atmungskette, durch die COX-Defizienz in der histochemischen Färbung repräsentiert, nehmen mit dem Lebensalter zu. Die Häufigkeit COX-defizienter Zellen nimmt in Muskelgeweben älterer Personen zu.

Deletionen der mtDNA sollen im Laufe des Lebens akkumulieren. In der vorliegenden Arbeit wurde der Δ mtDNA-Anteil in verschiedenen Geweben mit quantitativer Real-time PCR bestimmt, in Proben von Personen unterschiedlichen Alters (von 3 Monaten bis zu 99 Jahren).

1. Es konnte kein signifikanten Anstieg des Δ mtDNA-Anteils mit dem Lebensalter in den untersuchten Geweben festgestellt werden. Es wurde dabei Cortex cerebri und cerebelli, Herz- und Skelettmuskel untersucht.
2. Im Vergleich der unterschiedlichen untersuchten Gewebe zeigte äußere Augenmuskulatur häufiger COX-defiziente Muskelzellen, mehr mtDNA-Deletionen und weniger mtDNA-Kopien.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen Deletionen der mtDNA und Funktionsstörungen der oxidativen Phosphorylierung gezeigt werden, die mit dem Lebensalter zunehmen. Es konnte keine Akkumulation von mtDNA

Deletionen mit dem Lebensalter in allen Zellen eines Gewebes nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen keine eindeutige Bewertung eines Zusammenhangs zwischen Deletionen der mtDNA und dem Funktionsverlust der Mitochondrien im Alterungsprozess zu. Für weiterführenden Untersuchungen könnten Zellen eines Gewebes unter funktionellen und pathologischen Gesichtspunkten spezifiziert werden, um mögliche Auswirkungen von Deletionen der mtDNA auf so definierte Subpopulationen zu zeigen.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009). *Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms*. Cell 138: p.628-644.
- [2] McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2003). Mitochondria: more than just a powerhouse. Curr Biol 16: p.551-560.
- [3] Wallace DC (2010). *Mitochondrial DNA mutations in disease and aging*. Environ Mol Mutagen 51(5): p.440-450.
- [4] Benard G, Karbowski M (2009). *Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability*. Sem Cell Dev Biol 20: p.365-374.
- [5] Schimper AFW (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. Botan Zeit 41: p.105-114.
- [6] Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K (2001). *An overview of endosymbiotic models for the origin of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes) and their heterotrophic lifestyle*. Biol Chem 382: p.1521-1539.
- [7] Gray MW, Burger G, Lang BF (1999). *Mitochondrial evolution*. Sci 283: p.1476-1481.
- [8] Taylor FJR (1974). *Implications and extensions of the serial endosymbiosis theory of the origin of eukaryotes*. Taxon 23: p.229–258.
- [9] Warda M, Han J (2008). *Mitochondria, the missing link between body and soul: Proteomic prospective evidence*. Proteomics 8: p.1-23
- [10] Mitchell P (1961). *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature 191: p. 144-148.
- [11] Nass MM, Nass S (1963). *Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments*. J Cell Biol 19: p.613-629.

- [12] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MM, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PA, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981). *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature 290: p.457-465.
- [13] Satoh M, Kuroiwa T (1991). *Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell*. Exp Cell Res 196: p.137–140.
- [14] Cavelier L, Johannisson A, Gyllensten U (2000). *Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR*. Exp Cell Res 259: p.79–85.
- [15] Buselmaier W (2003). *Biologie für Mediziner*. 9. Aufl. Springer Verlag, Berlin: p.246-250.
- [16] Larsson NG, Clayton DA (1995). *Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders*. Annu Rev Genet 29: p.151-178.
- [17] Neupert W (1997). *Protein import into mitochondria*. Annu Rev Biochem 66: p.863–917.
- [18] Clayton DA (2000). *Transcription and replication of mitochondrial DNA*. Hum Reprod 15 Suppl 2: p.11-17.
- [19] Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole J, Brandon MC, Mishmar D, Yi C, Kreuziger J, Baldi P, and Wallace DC (2007). *An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny*. Nucleic Acids Research 35 (Database issue):D823-D828. URL: <http://www.mitomap.org>.
- [20] Alberts B, Johnson A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Aufl Wiley-VCH Verlag, Berlin: p.944-946.
- [21] Knippers R (2006). *Molekulare Genetik*. 9. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart: p.455-471.
- [22] Taanman JW (1999). *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. Biochim Biophys Acta 1410: p.103-123.

- [23] King MP, Attardi G (1989). *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation*. Science 246: p.500-503.
- [24] Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF, Yonekawa H (1995). *Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis*. Proc Natl Acad Sci USA 92: p.4542-4546.
- [25] Schwartz M, Vissing J (2002). *Paternal inheritance of mitochondrial DNA*. N Engl J Med 347: p.576-580.
- [26] Schwartz M, Vissing J (2004). *No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA Mutations*. J Neurol Sci 218: p.99-101.
- [27] Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL, Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Zeviani M, Briem E, Carrara F, Turnbull DM (2003). *Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution*. Ann Neurol 54: p.521-524.
- [28] White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ (2008). *Revealing the hidden complexities of mtDNA Inheritance*. Mol Ecology 17: p.4925-4942.
- [29] Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J et al. (2000). *Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos*. Bio Rep 68: p.1793-1800.
- [30] Bogenhagen D, Clayton DA (1977). *Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle*. Cell 11: p.719-727.
- [31] Birky CW (2001). *The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms and models*. Ann Rev Genet 35: p.125-148.
- [32] Clayton DA (1982). *Replication of animal mitochondrial DNA*. Cell 28: p.693-705.
- [33] Kaguni LS (2004). *DNA Polymerase γ , the mitochondrial replicase*. Annu Rev Biochem 73: p.293-320.

- [34] Meissner C (2007). *Mutations of mitochondrial DNA- cause or consequence of the ageing process*. Gerontol Geriat 40: p.325-333.
- [35] Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, Wanrooij S, Spelbrink JN, Lightowlers RN, Turnbull DM (2008). *What causes mitochondrial DNA Deletions in human cells?* Nat Genet 40 (3): p.275-279.
- [36] Schmitt ME, Clayton DA. (1993) Conserved features of yeast and mammalian mitochondrial DNA replication. Curr Opin Genet Dev 3: p.769–74.
- [37] Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jakobs HT, Huberman JA, Holt IJ (2003). *Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone*. J Biol Chem 278: p.50961–50969
- [38] Brown WM, George MJ, Wilson AC. (1979). *Rapid evolution of animal mitochondrial in mammalian cells*. J Biol Chem 272: p.25409– 25412.
- [39] Hiona A, Leeuwenburgh C (2008). *The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarkopenia: Implications for the vicious cycle theory of aging*. Exp Geront 43: p.24-34.
- [40] Chinnery PF and Schon EA (2003). *Mitochondria*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74: p.1188-1199
- [41] Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, et al (1997). *Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes*. Brain 120: p.1713–1721.
- [42] White SL, Collins VA, Woolfe R, Cleary MA, Shanske S, DiMauro S, Dahl HH, Thorburn DR (1999). *Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993*. Am J Hum Genet 65 (2): p.474–482.
- [43] Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius BA (1962). *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 41: p.1776-1804.

[44] Thorburn DR, Dahl HH (2001). *Mitochondrial Disorders: Genetics, Counseling, Prenatal Diagnosis and Reproductive Options*. Am J Med Gen 106: p.102-114.

[45] Taylor, RW, Turnbull, DM (2005). *Mitochondrial DNA mutation in human disease*. Nature Rev Genet 6: p.389-402.

[46] Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988). *Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies*. Nature 331 Nature 331: p.717-719.

[47] Hudson G, Chinnery PF (2006). *Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease*. Hum Mol Genet 15: p.244–252.

[48] Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S (1989). *A direct repeat is a hot spot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA*. Science 244: p.346-349.

[49] Jacksch-Angerer M, Hofmann S, Bauer MF, Gempel K, Obermaier-Kusser B, Paetzke I, Gerbitz KD (1999). *Mitochondriale Erkrankungen*. Deutsches Ärzteblatt 96: p.2972-2981.

[50] Cao Z, Wanagat J, Mckiernan SH, Aiken JM (2001). *Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection*. Nucleic Acids Res 29: p.4502–4508.

[51] Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, et al. (2000). *The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?* Trends Genet 16: p.500–505.

[52] Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, et al (1998). *MELAS and MERRF: the relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring*. Brain 121: p.1889–1894.

[53] Chinnery PF, Samuels DC (1999). *Relaxed replication of mtDNA: a model with implications for the expression of disease*. Am J Hum Genet 64: p.1158–1165.

[54] Birky CW (1995). *Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution*. Proc Natl Acad Sci USA 92: p.11331-8.

[55] Lin MT, Beal MF (2006). *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative disease*. Nature 443: p.787-795.

[56] Trifunovic A, Larsson NG (2008). *Mitochondrial Dysfunction as a cause of ageing*. J Intern Med 263 (2): p.157-178.

[57] Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G (1999). *Ageing-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication*. Science 286: p.774-779.

[58] Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, Miller CA, Askanas V, Engel WK, Bhasin S, Attardi G (2001). *Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication*. Proc Natl Acad Sci USA 98: p.4022-4027.

[59] Murphy R, Turnbull DM, Walker M, Hattersley AT (2008). *Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation*. Diabet Med 25 (4): p.383-399.

[60] Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, Reichmann H, Riederer P, Vieregge P, Wüllner U, Gasser T (2008). *Genes associated with Parkinson syndrome*. J Neurol 255: p.8-17.

[61] Kadenbach B, Munscher C, Frank V, Müller-Hocker J, Napiwotzki J (1995). *Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA*, Mutat Res 338: p.161–172.

- [62] Fayet G, Jansson M, Sternberg D, Moslemi AR, Blondy P, Lombes A, Fardeau M, Oldfors A (2002). *Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function*. *Neuromuscul Disord* 12: p.484–493.
- [63] Trifunovic A (2006). *Mitochondrial DNA and aging*. *Biochem Biophys Acta* 1757: p.611-617.
- [64] Sciacchio M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT (1994). *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* 3: p.13-19.
- [65] Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC, Bielas JH, Rabinovitch PS, Prolla TA, Loeb LA (2008). *DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mouse*. *Nat Gen* 40: p.392-394.
- [66] Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K (2006). *Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged substantia nigra neurons*. *Nat Genet* 38 (5): p.518-520.
- [67] Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM (2006). *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. *Nat Genet* 38 (5): p.515-517.
- [68] Cortopassi GA, Arnheim N (1990). *Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans*. *Nucleic Acids Res* 18: p.6927-6933.
- [69] Cortopassi GA, Arnheim N (1992). *Using the polymerase chain reaction to estimate mutation frequencies and rates in human cells*. *Mutat Res* 277: p.239-249.
- [70] Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC (1992). *Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age*. *Nat Genet* 2: p.324-329.

[71] Taylor RW et al. (2003). *Mitochondrial DNA Mutations in human colonic crypt stem cells*. J Clin Invest 112: p.1351-1360.

[72] Alexeyew MF, Ledoux SP, Wilson GL (2004). *Mitochondrial DNA and aging*. Clin Sci 107: p.355-364.

[73] Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA (2005). *Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging*. Science 309: p.481–484.

[74] Harman D (1956). *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol 11: p.298–300.

[75] Orgel LE (1963). *The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing*. Proc Natl Acad Sci USA 17: p.517-521.

[76] Franceschi C (1989). *Cell proliferation and cell death in the aging process*. Aging Clin Exp Res 1: p.3-13.

[77] Shay JW, Wright WE (2007). *Hallmarks of telomeres in ageing research*. J Pathol 211 (2): p.114-123.

[78] Harman D (1972). *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc 20: p.145–147.

[79] Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M (1989). *Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases*. Lancet 1: p642–645.

[80] St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. J Biol Chem 277: p.44784–44790.

[81] Cerda S, Weitzman SA (1997). *Influence of oxygen radical injury on DNA methylation*. Mutat Res 386: p.141-152.

[82] McCord JM, Friedovich I (1969) *Superoxid dismutase. An enzymic function or erythrocytorein (hemocytorein)*. J Biol Chem 244: p.6049-6055.

[83] Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996). *Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: p.9782–9787.

[84] Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ (1995). *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase*. Nat. Genet. 11: p.376–381.

[85] Schriener SE et al (2005). *Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria*. Science 308: p.1909–1911.

[86] Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005). *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. Biochemistry (Mosc.) 70: p.200–214.

[87] Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ (2005). *Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?* Mitochondrion 5 (2): p.89-108.

[88] Müller-Höcker J, Pongratz D, Hübner G (1983). *Focal deficiency of cytochrome-c-oxidase in skeletal muscle of patients with progressive external ophthalmoplegia. Cytochemical-fine-structural study*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 402: p.61-71.

[89] Johnson MA, Turnbull DM, Dick DJ, Sherratt HS (1983). *A partial deficiency of cytochrome c oxidase in chronic progressive external ophthalmoplegia*. J Neurol Sci 60: p.31-53.

[90] Mita S, Schmidt B, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E (1989). *Detection of „deleted“ mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome*. Proc Natl Acad Sci USA 86: p.9509-9513.

[91] Müller-Höcker J (1989). *Cytochrome c oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart- an age-related phenomenon: a histochemical ultracytochemical study*. Am J Pathol 134: p.1167-1173.

[92] Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS (1968). *Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB)*. J Cell Biol 38: p.1–14.

[93] Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). *NeuN , a neuronal specific nuclear protein in vertebrates*. Development 116: p.201-211.

[94] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996). *Laser capture microdissection*. Science 274: p.998-1001.

[95] Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R (1994). *Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA*. Proc Natl Acad Sci USA 91: p.5695-5699.

[96] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). *Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplifications reactions*. Biotechnology 11: p.1026-1030.

[97] Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM (2006). *Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers*. Am J Hum Gen 79: p.469-480.

[98] He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM (2002). *Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR*. Nucleic Acids Res. 30; 14: e68.

[99] Krishnan KJ, Bender A, Taylor RW, Turnbull DM (2007). *A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells*. An Biochem 370: p.127-129.

- [100] Brierley EJ, Johnson MA, James OFW, Turnbull DM (1996). *Effects of physical activity and age on mitochondrial function*. Q J Med 89: p.251-258.
- [101] Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, James OFW, Turnbull DM (1998). *Role of mitochondrial DNA mutations in human ageing: implications for the central nervous system and muscle*. Ann Neurol 43: p.217-223.
- [102] Müller-Höcker J (1990). *Cytochrom c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: An age-related alteration*. J Neurol Sci 100: p.14-21.
- [103] Müller-Höcker J, Schneiderbanger K, Stefani FH, Kadenbach B (1992). *Progressive loss of cytochrome-c-oxidase in the human extraocular-muscles in aging: a cytochemical-immunohistochemical study*. Mutat Res 257: p.115-124.
- [104] Müller-Höcker J, Seibel P, Schneiderbanger K, Kadenbach B (1993). *Different in situ hybridization patterns of mitochondrial DNA in cytochrom-c-oxidase-deficient extraocular muscle fibres in the elderly*. Virchows Archiv A Pathol Anat 422: p.7-15.
- [105] Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2001). *Mitochondrial enzyme deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD*. Neurology 57(2): p.260-264.
- [106] Itoh K, Weis S, Mehraein P, Müller-Höcker J (1996). *Cytochrom c oxidase defects of the human substantia nigra in normal aging*. Neurobiol Aging 17;6: p.843-848.
- [107] Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, et al (1992). *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 USA 89: p.4221-4225.
- [108] Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA (1992). *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 51: p.1187-1200.

- [109] Greaves LC, Yu-Wai-Man P, Blakely EL, Krishnan KJ, Beadle NE, Kerin J, Barron MJ, Griffiths PG, Dickinson AJ, Turnbull DM, Taylor RW (2010). *Mitochondrial DNA defects and selective extraocular muscle involvement in CPEO*. Invest Ophthalmol 51: p.3340-3346.
- [110] Schon EA et al. (1997) *Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis*. J Bioenerg Biomembr 29: p.131–149.
- [111] Hayashi JI, Ohta S, Kikuchi QA, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I (1991). *Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A 88: p.10614–10618.
- [112] Yu-Wai-Man P, Lai-Cheong J, Borthwick GM, He L, Taylor GA, Greaves LC, Taylor RW, Griffiths PG, Turnbull DM (2010). *Somatic mitochondrial DNA deletions accumulate to high levels in aging human extraocular muscles*. Invest Ophthalmol Vis Sci 51: p.3340-3346.
- [113] Alemi M, Prigione A, Wong A, Schoenfeld R, DiMauro S, Hirano M, Taroni F, Cortopassi G (2007). *Mitochondrial DNA deletions inhibit proteasomal activity and stimulate an autophagic transcript*. Free Rad Biol & Med 42: p.32-43.
- [114] Porteus WK, James AM, Sheard PW, Porteus CM, Packer MA, Hyslop SJ, Melton JV, Pang CY, Wei YM, Murphy MP (1998). *Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977bp mitochondrial DNA deletion*. Eur J Biochem 257: p.192-201.
- [115] Bua EA, McKiernan SH, Wanagat J, McKenzie D, Aiken JM (2002). *Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia*. J Appl Physiol 92: p.2617-2624.
- [116] Khrapko K, Bodyak N, Thilly WG, van Orsouw NJ, Zhang X, Coller HA, Perls TT, Upton M, Vijg J, Wei JY (1999). *Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions*. Nucleic Acids Res 27: p.2434-2441.
- [117] Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A, Hood DA (2008). *Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle*. Aging Cell 7: p.2-12.

[118] Bender A, Schwarzkopf RM, McMillan A, Krishnan KJ, Rieder G, Neumann M, Elstner M, Turnbull DM, Klopstock T (2008). *Dopaminergic midbrain neurons are the prime target for mitochondrial DNA deletions*. J Neurol 255: p.1231-1235.

[119] Beal MF (2003). *Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci 991: p.120-131.

[120] Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A (2004). *Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study*. Lancet 364: p.875-882.

[121] Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004). *Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase*. Nature 429: p.417–423.

[122] Yu Wai Man CY, Chinnery PF, Griffiths PG (2005). *Extraocular muscles have fundamentally distinct properties that make them selectively vulnerable to certain disorders*. Neuromuscul Disord 15: p.17-23.

[123] Spencer RF, Potter JD (2006). *Biological organization of the extraocular muscles*. Prog Brain REs 151: p.43-80.

[124] Carry MR, Ringel SP, Starcevich JM (1986). *Mitochondrial morphometrics of histochemically identified human extraocular-muscle fibers*. Anat Rec 214: p.8-16.

[125] Fuchs AF, Binder MD (1983). *Fatigue resistance of human extraocular muscles*. J Neurophysiol 49: p.28-34.

[126] McLoon LK, Wirtschafter JD (2003). *Activated satellite cells in extraocular muscles of normal adult monkeys and humans*. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: p.1927-1932.

- [127] McLoon LK, Rowe J, Wirtschatter JD, McCormick KM (2004). *Continuous myofiber remodeling in uninjured extraocular myofibers: myonuclear turnover and evidence for apoptosis*. Muscle Nerve 29: p.707-715.
- [128] Cooper JM, Mann VM, Schapira AHV (1992). *Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing*. J Neurol Sci 113: p.91-98.
- [129] Vielhaber S, Kudin A, Schröder R, Elger CE, Kunz WS (2000). *Muscle fibres: applications for the study of the metabolic consequences of enzyme deficiencies in skeletal muscle*. Biochem Societ Transact 28: p.159-164.
- [130] Shoubridge EA, Karpati G, Hastings KEM (1990). *Deletion mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal-muscle fiber segments in mitochondrial disease*. Cell 62: p.43-49.
- [131] Durham SE, Samuels DC, Cree LM, Chinnery PF (2007). *Normal levels of wild-type mitochondrial DNA maintain cytochrome c oxidase activity for two pathogenic mitochondrial DNA mutations but not for m.3243A→G*. Am J Hum Genet 81: p.189-195.
- [132] Melov S, Shoffner JM, Kaufman A, Wallace DC (1995). *Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle*. Nucleic Acids Res 23; 20: p.4122-4126.
- [133] Chabi B, Mousson de Camaret B, Chevrollier A, Boisgard S, Stepien G (2005). *Random mtDNA deletions and functional consequence in aged human skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Com 332: p.542-549.
- [134] Reynier P, Malthiery Y (1995). *Accumulation of deletions in mtDNA during tissue aging: analysis by long PCR*. Biochem Biophys Res Commun 217: p.59-67.
- [135] Moslemi A, Melberg A, Holme E, Oldfors A (1996). *Clonal expansion of mitochondrial DNA with multiple deletions in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia*. Ann Neurol 40: p.707-713.

- [136] Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M (2007). *Effects of antioxidant supplementation on the aging process*. Clin Interv Aging 2: p.377-387.
- [137] Wenz T (2009). *PGC-1 α Activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease*. IUBMB Life 61: p.1051-1062.
- [138] Bastin J, Aubey F, Rotig A, Munnich A, Djouadi F (2008). *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor pathway stimulates the mitochondrial respiratory chain and can correct deficiencies in patients' lacking its components*. J Clin Endocrinol Metab 93: p.1433-1441.
- [139] Bonnefont JP, Bastin J, Behin A, Djouadi F (2009). *Bezafibrate for an inborn mitochondrial β -oxidation defect*. N Engl J Med 360: p.838-840.
- [140] Bender A, Beckers J, Schneider I, Hölter SM, Haack T, Ruthsatz T, Vogt-Weisenhorn DM, Becker L, Genius J, Rujescu D, Imler M, Mijalski T, Mader M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Wurst W, Schmidt J, Klopstock T (2008). *Creatine improves health and survival of mice*. Neurobiol Aging 29: p.1404-1411.
- [141] Matthews RT, Ferrante RJ, Klivenyi P, Yang L, Klein AM, Mueller G, Kadurah-Daouk R, Beal MF (1999). *Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity*. Exp Neurol 157: p.142-149.
- [142] Bender A, Koch W, Elstner M, Schombacher Y, Bender J, Moeschl M, Gekeler F, Müller-Myhsok B, Gasser T, Tatsch K, Klopstock T (2006). *Creatine supplementation in Parkinson disease: A placebo-controlled randomized pilot trial*. Neurology 67: p.1262-1264.
- [143] Lee CK, Pugh TD, Klopp RG, Edwards J, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA (2004). *The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression in mice*. Free Radic Biol Med 36:p.1043-1057.
- [144] Schultz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007). *Glucose restriction extends Caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress*. Cell Metab 6: p.280-293.

[145] Fontana L (2009). *The scientific basis of caloric restriction leading to longer life*. Curr Opin Gastroenterol 25: p.144-150.

[146] Hofer T, Fontana L, Weiss EP, Anton SD, Villareal D, Malayappan B, Leeuwenburgh C (2008). *Long-term effects of caloric restriction or exercise on DNA and RNA oxidation levels in white blood cells and urine in humans*. Rejuvenation Res 11: p.793-799.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-oxo-2'-deoxyguanosin
Abb	Abbildung
ad-CPEO	autosomal dominante Form der CPEO
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
COX	Cytochrom C Oxidase
CPEO	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CT	Cycle Threshold
Cyt b	Cytochrom b
D-Loop	Displacement Loop
Δ mtDNA	MtDNA mit Deletionen
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
FADH	Flavinadenindinukleotid
Gl	Gleichung
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
KSS	Kearns Sayre Syndrom
mtDNA	Mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NeuN	Neuronal Nuclei
nDNA	Nukleäre DNA
OH	Origin of replication (Replikationsursprung) der schweren Kette
OL	Origin of replication (Replikationsursprung) der leichten Kette
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
SDH	Succinat-Dehydrogenase
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Poly	Polymerase γ
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	Ribosomale RNA
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
SET	Serial endosymbiosis theorie
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TIM	Translocase of inner mitochondrial membrane

TOM	Translocase of outer mitochondrial membrane
tRNA	Transfer-RNA
wt	Wildtyp

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Bender für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Forschungsgruppe und vor allem für die freundschaftliche Unterstützung und Förderung auch über die wissenschaftliche Tätigkeit hinaus. Er war zu jeder Zeit ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mein Interesse an dem faszinierenden Gebiet der molekularen Neurogenetik durch die umsichtige Auswahl des Themas dieser Arbeit und deren konstruktive Betreuung geweckt und vertieft hat. Desweiteren bedanke ich mich für die Vetreterung der vorliegenden Arbeit gegenüber der medizinischen Fakultät sowie der Universität.

Herrn Prof Dr. Klopstock danke ich herzlich für die wertvolle fachliche und persönliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Müller-Höcker und Herrn Prof. Dr. med. Meißner danke ich für die freundliche Überlassung der verwendeten Gewebeprobe.

Ich danke Frau Prof. Dr. Dieterich und Herrn FRCP Prof. Dr. Brandt dafür, dass ich diese Arbeit in der von ihnen geleiteten Klinik und Poliklinik für Neurologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen durfte.

Ich danke weiterhin Herrn Prof. Dr. Dichgans für die im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellten Laborräume der Arbeitsgruppe molekulare Neurogenetik.