

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

Mitochondriale Dysfunktion bei Parkin-Mausmodellen des Morbus Parkinson

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

vorgelegt von
Johannes Amadeus Ludwig Markus Hauer

aus
München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

| | |
|---|--|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Andreas Bender |
| Mitberichterstatter: | Priv. Doz. Dr. Rupert Egensperger Prof. Dr. Gerhard F. Hamann |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | -- |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 30.03.2017 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1. Der Morbus Parkinson | 4 |
| 1.1.1. Klinik des Morbus Parkinson | 4 |
| 1.1.2. Pathophysiologische Grundlage der motorischen Symptomatik | 4 |
| 1.1.3. Therapie des Morbus Parkinson..... | 5 |
| 1.1.4. Neuropathologische Befunde des Morbus Parkinson | 5 |
| 1.1.5. Ätiologie des Morbus Parkinson | 6 |
| 1.1.6. Molekulare Mechanismen des Morbus Parkinson | 6 |
| 1.2. Mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese des Morbus Parkinson | 8 |
| 1.2.1. Zusammenhänge zwischen mtDNA und Morbus Parkinson | 8 |
| 1.2.1.1. mtDNA-Deletionen..... | 8 |
| 1.2.1.2. mtDNA-Kopienzahl | 10 |
| 1.3. Parkin | 11 |
| 1.3.1. Physiologische Funktion | 11 |
| 1.3.2. Parkin-assoziiertes Parkinson-Syndrom | 12 |
| 1.3.2.1. Genetik | 12 |
| 1.3.2.2. Pathophysiologie und neuropathologische Befunde | 12 |
| 1.3.2.3. Klinische Charakteristika | 13 |
| 1.3.3. Interaktionen von Parkin und mitochondrialem Metabolismus | 14 |
| 1.3.4. Parkin-Tiermodelle des Morbus Parkinson | 15 |
| 1.3.4.1. Parkin-Mausmodelle | 15 |
| 1.3.4.2. Parkin-Drosophilamodelle..... | 16 |
| 2. Zielsetzung | 17 |
| 3. Material und Methoden | 18 |
| 3.1. Verwendetes Tiermodell | 18 |
| 3.2. DNA-Isolation | 19 |
| 3.2.1. Anfertigung histologischer Schnitte | 19 |
| 3.2.2. Färbungen | 20 |
| 3.2.2.1. Nissl-Färbung | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2.2. Anti-TH-Färbung..... | 21 |
| 3.2.3. Lasermikrodissektion | 22 |
| 3.2.4. DNA-Extraktion | 23 |
| 3.2.4.1. DNA-Extraktion aus Homogenat..... | 23 |
| 3.2.4.2. DNA-Extraktion aus Hippocampus und Substantia nigra | 24 |
| 3.3. Bestimmung von mtDNA-Kopienzahl und Deletionsgrad | 25 |
| 3.3.1. Das Prinzip der PCR | 25 |
| 3.3.2. Die quantitative realtime-PCR..... | 25 |
| 3.3.3. Der C _t -Wert | 26 |
| 3.3.4. Rechenmodelle auf Grundlage des C _t -Wertes..... | 28 |
| 3.3.4.1. Die relative Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl aus Homogenat..... | 28 |
| 3.3.4.2. Die absolute Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl aus Hippocampus und Substantia nigra..... | 29 |
| 3.3.4.3. Die Bestimmung des Deletionsgrades | 29 |
| 3.4. Die Messung der Mitochondrienzahl..... | 30 |
| 3.4.1. Proteinisolation aus Homogenat..... | 30 |
| 3.4.2. Protein-Konzentrationsmessung mittels BCA-Assay | 30 |
| 3.4.3. Western Blot | 32 |
| 3.5. Statistik..... | 35 |
| 3.5.1. Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl in Abhängigkeit vom Parkin-Expressionsprofil . | 35 |
| 3.5.2. Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl mit zunehmendem Alter..... | 36 |
| 3.5.3. Deletionsgrad in Abhängigkeit von der anatomischen Region..... | 36 |
| 4. Ergebnisse..... | 37 |
| 4.1. Deletionsgrad | 37 |
| 4.1.1. Zusammenhang zwischen Deletionsgrad und Parkin-Expressionsprofil..... | 37 |
| 4.1.2. Zusammenhang zwischen Deletionsgrad und Alter..... | 38 |
| 4.1.3. Zusammenhang zwischen Deletionsgrad und der anatomischen Region..... | 40 |
| 4.2. mtDNA-Kopienzahl | 41 |
| 4.2.1. Zusammenhang zwischen mtDNA-Kopienzahl und Parkin-Expressionsprofil..... | 41 |
| 4.2.2. Zusammenhang zwischen mtDNA-Kopienzahl und Alter | 43 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Untersuchung der Mitochondrienzahl mittels Western Blot | 43 |
| 4.4. Zusammenfassung der Befunde | 44 |
| 5. Diskussion | 46 |
| 5.1. Einfluss der Parkin-Expression auf Biogenese und Deletionsgrad | 46 |
| 5.1.1. Vermehrte Biogenese bei jungen Mäusen mit Parkin-Knockout | 46 |
| 5.1.2. Akkumulation von Deletionen bei Mäusen, die humanes Parkin exprimieren | 48 |
| 5.1.3. Keine Auswirkungen der Stop-Mutation | 49 |
| 5.1.4. Kritische Bewertung der Ergebnisse | 50 |
| 5.1.4.1. Methodische Limitierungen | 50 |
| 5.1.4.2. Rolle der mtDNA in der Pathogenese des Morbus Parkinson | 51 |
| 5.1.4.3. Vorschläge für zukünftige Studien | 51 |
| 5.2. Einfluss des Alters auf Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl | 52 |
| 5.2.1. Verlauf der Deletionsgrade im Alterungsprozess | 52 |
| 5.2.2. Verlauf der mtDNA-Kopienzahl im Alterungsprozess | 53 |
| 5.2.3. Vergleichbarkeit des Alterungsprozesses von Maus und Mensch | 53 |
| 5.3. Unterschiede zwischen den einzelnen anatomischen Regionen | 54 |
| 6. Zusammenfassung | 57 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis | 59 |
| 8. Literaturverzeichnis | 60 |
| 9. Danksagung | 67 |
| 10. Curriculum vitae | 68 |
| 11. Eidesstattliche Versicherung | 70 |

1. Einleitung

Ziel dieses Projektes war, den Einfluss verschiedener Parkin-Expressionsmuster auf die Häufigkeit von Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) sowie auf die mtDNA-Kopienzahl in Parkin-Mausmodellen des Morbus Parkinson zu untersuchen. Beim Morbus Parkinson handelt es sich um die häufigste Bewegungsstörung und die nach dem Morbus Alzheimer zweithäufigste neurodegenerative Krankheit [1]. Die Angaben zur Prävalenz variieren zwischen verschiedenen Studien, liegen aber meistens in einer Größenordnung von etwa 1-5 % [2]. Die Erkrankung beginnt meist um das 60. Lebensjahr und schreitet kontinuierlich fort bis zum Tod, der durchschnittlich 15 Jahre nach dem Zeitpunkt der Diagnosestellung eintritt [3]. In etwa 90 % der Fälle ist der Morbus Parkinson idiopathisch, in den restlichen Fällen liegen familiäre Varianten mit spezifischen genetischen Defekten, unter anderem im Parkin-Gen, vor [1]. Die mitochondriale Dysfunktion könnte in der Pathogenese des Morbus Parkinson eine Rolle spielen und stellt ein potentielles Ziel für Therapien, die den Krankheitsprozess aufhalten könnten, dar [4]. Daher ist es von großem Interesse, die Zusammenhänge zwischen Parkin und der mtDNA zu erforschen.

1.1. Der Morbus Parkinson

1.1.1. Klinik des Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson ist gekennzeichnet durch das Auftreten der vier Kardinalsymptome Rigor, Tremor, Bradykinesie und posturale Instabilität [5]. Je nach Ausprägung der einzelnen Symptome unterscheidet man den akinetisch-rigiden, den Äquivalenz- und den Tremordominanz-Typ sowie den monosymptomatischen Ruhetremor [5]. Neben der motorischen Symptomatik können weitere Symptome auftreten. Dazu gehören psychische Störungen wie Verhaltensauffälligkeiten und kognitive Einbußen, vegetative Dysregulation und Schlafstörungen [6].

1.1.2. Pathophysiologische Grundlage der motorischen Symptomatik

Als pathophysiologische Grundlage der motorischen Symptomatik des Morbus Parkinson wird eine übermäßige Hemmung von motorischen Netzwerken des Hirnstamms und des thalamokortikalen Systems angenommen, die auf einer vermehrten Aktivität der Efferenzen des Globus pallidus internus und der Pars reticulata der Substantia nigra beruhen [7]. Bei diesen Strukturen handelt es sich um Areale der Basalganglien, einer Gruppe von subkortikalen, untereinander verschalteten Kerngebieten des Telenzephalon, Diencephalon und Mittelhirns, die eine zentrale Rolle bei sämtlichen Formen der Bewegungsstörungen einnimmt [8]. Nach dem klassischen Konzept gibt es eine direkte striatale und eine indirekte, über den Nucleus subthalamicus laufende Leitungsbahn, deren verminderte Hemmung bzw. vermehrte Erregung zu einer gesteigerten Aktivität des Globus pallidus und der Pars reticulata der Substantia nigra führen [8]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass dieses Konzept keinen pathophysiologisch umfassend zufriedenstellenden Erklärungsansatz darstellt [7]. Gegenwärtig geht man davon aus, dass der Bewegungsplanung ein komplexes Zusammenspiel sowohl von Interaktionen der Basalganglien mit dem Kortex über kortikostriatale

und kortikosubthalamische Bahnen als auch von zahlreichen Verschaltungen innerhalb der Basalganglien selbst zugrunde liegt [7].

1.1.3. Therapie des Morbus Parkinson

Grundprinzip der derzeitigen Therapie ist entweder die Erhöhung des Dopamin-Spiegels durch Substitution oder Hemmung des Abbaus des Neurotransmitters oder der Einsatz von Dopaminrezeptor-Agonisten [9].

Als die wirksamste Therapie hat sich L-Dopa, die Vorstufe von Dopamin, erwiesen [9]. Nachteil der Behandlung mit L-Dopa ist das Auftreten von Wirkungsfluktuationen und Dyskinesien nach langjähriger Anwendung [9]. Als weitere Therapieoptionen stehen noch andere Wirkstoffgruppen wie Dopaminrezeptor-Agonisten und Inhibitoren des Dopamin-Metabolismus (COMT- und MAO-B-Hemmer) zur Verfügung [9].

Für L-Dopa sowie für den Dopaminrezeptor-Agonisten Apomorphin besteht neben der oralen Anwendung zudem die Möglichkeit der kontinuierlichen Gabe mittels Pumpe über eine intrajejunale bzw. subkutane Sonde [10]. Als operative Behandlungsoption kann die tiefe Hirnstimulation erwogen werden, bei der Elektroden in verschiedene Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) implantiert werden, bevorzugt dienen der Globus pallidus internus oder der Nucleus subthalamicus als Zielregion [11].

Die hier genannten Therapieoptionen zielen lediglich auf die Verbesserung der motorischen Symptomatik. Eine Therapie, die den zugrundeliegenden neurodegenerativen Prozess aufhalten könnte, steht momentan noch nicht zur Verfügung [1].

1.1.4. Neuropathologische Befunde des Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch den Verlust dopaminerger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra sowie noradrenerger Neurone des Locus coeruleus charakterisiert ist [12]. Die Angaben zum Ausmaß des Zelluntergangs, ab dem motorische Symptome auftreten, schwanken zwischen 30 [13] und 70 % der Zellen [14]. Mikroskopisch sind die betroffenen Zellen durch sogenannte Lewykörper und Lewyneuriten gekennzeichnet, bei denen es sich um α -Synuclein-immunoreaktive Einschlüsse in den Neuronen handelt (s. Abb. 1.1. [15])

[16]. Diese Einschlüsse sind überwiegend in der Pars compacta der Substantia nigra festzustellen und führen durch einen Untergang Melanin-haltiger Neurone zu einer Depigmentierung dieser

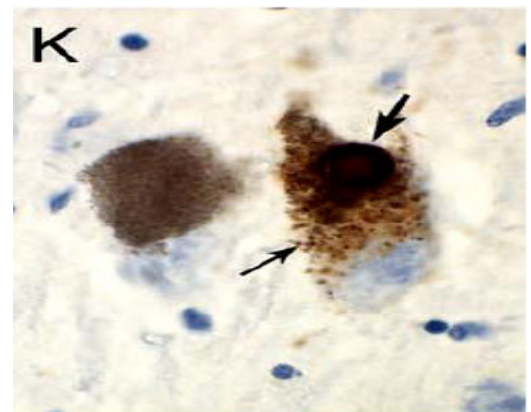


Abb. 1.1. (aus [15]): Darstellung eines Neurons ohne α -Synuclein-Ablagerung (links) bzw. mit α -Synuclein-Einschlüssen (rechts). Die Pfeile markieren α -Synuclein-Aggregate.

Region [17]. Darüber hinaus liegen sie jedoch auch in weiteren Regionen des ZNS sowie im peripheren und enterischen Nervensystem vor [16]. Zwar sind viele verschiedene Regionen des Nervensystems betroffen [16], doch zeichnen sich die anfälligen Neurone durch gewisse Gemeinsamkeiten aus: Es handelt sich vornehmlich um lange, dünne und kaum myelinisierte Neurone [15].

1.1.5. Ätiologie des Morbus Parkinson

Die genaue Ätiologie des dem Morbus Parkinson zugrunde liegenden neurodegenerativen Prozesses ist nicht eindeutig geklärt, es scheinen verschiedene Faktoren die Krankheitsentstehung zu begünstigen [18].

Wichtigster Risikofaktor ist das Alter [3]. Darüber hinaus wird auch diversen Umwelteinflüssen eine Rolle in der Pathogenese zugeschrieben [6]. Beispielsweise stehen Pestizide, Herbizide, Metalle und andere Stoffe im Verdacht, das Erkrankungsrisiko zu erhöhen [6]. Auch Berufstätigkeit in der Landwirtschaft und Leben in ländlichen Gegenden ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert [19]. Auf der anderen Seite gibt es auch Substanzen, denen protektive Faktoren zugeschrieben werden, wie zum Beispiel Nikotin, Koffein und Harnsäure [6].

Ein weiterer sehr bedeutender Aspekt in der Pathogenese ist die individuelle genetische Prädisposition. In den vergangenen 15 Jahren stellte die Analyse des Genoms einen wichtigen Teilbereich der Parkinson-Forschung dar und lieferte mehrere Gene bzw. Loci, die das Erkrankungsrisiko erhöhen [20]. Derzeit sind etwa 16 solcher Suszeptibilitätsgene wie LRRK2, MAPT und SNCA bekannt [20]. Neben diesen Suszeptibilitätsgenen wurden auch mehrere Gene identifiziert, die ein familiäres Parkinson-Syndrom gemäß der Mendelschen Vererbungsregeln nach autosomal-dominantem oder autosomal-rezessivem Erbgang verursachen. Das autosomal-dominant vererbte Parkinson-Syndrom tritt in Folge von Mutationen zweier Gene, SNCA und LRRK2, auf [20]. Als Auslöser eines autosomal-rezessiv vererbten Parkinson-Syndroms gelten PARK2, PINK1, DJ1, ATP13A2, FBXO7 und PLA2G6. Die drei erst genannten sind mit einem frühen Krankheitsbeginn assoziiert, während bei den letztgenannten zum Parkinson-Syndrom weitere klinische Auffälligkeiten wie beispielsweise Pyramidenbahnzeichen und kognitive Einbußen hinzutreten [21]. Varianten der Gene, die familiäre Parkinson-Formen auslösen, werden auch mit der sporadischen Krankheitsform assoziiert, weshalb eine ätiologische Verwandtschaft von familiären und sporadischen Krankheitsformen angenommen wird [22]. Das macht die Gene des familiären Parkinson-Syndroms trotz ihrer relativen Seltenheit zu einem interessanten Ziel für die Forschung, da man sich von ihnen neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Erkrankung und Therapieansätze auch für die idiopathische Erkrankung verspricht [20].

1.1.6. Molekulare Mechanismen des Morbus Parkinson

Es werden mehrere mögliche Erklärungen für die molekularen Mechanismen der Neurodegeneration beim Morbus Parkinson diskutiert. Unter anderem könnten oxidativer Stress,

inflammatorische und exzitotoxische Prozesse sowie mitochondriale Dysfunktion eine Rolle spielen [23]. Aufgrund der Vielzahl der diskutierten Ansätze wird auch die Multiple-Hit-Hypothese postuliert, die besagt, dass eine Kombination dieser Stressoren zusammen mit dem Versagen neuroprotektiver Kompensationsmechanismen die Zelle permanent schädigt, bis es schließlich zur Induktion der Apoptose kommt [24].

Eine sehr bedeutende Rolle in der Neurodegeneration spielt die mitochondriale Dysfunktion, die zum einen zu einem Energiemangel der Zelle und zum anderen zum vermehrten Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt [23]. Die Generierung von ROS ist ein physiologischer Prozess, der unter anderem bei der Immunantwort von Bedeutung ist, jedoch werden ROS auch für eine Reihe zellschädigender Effekte verantwortlich gemacht [25]. Neurone sind besonders anfällig gegen eine Akkumulation von ROS [25], weshalb diese einen Hauptmechanismus in der Neurodegeneration darstellen könnte [26]. Dabei steht insbesondere das Mitochondrium als Ort der Atmungskette im Mittelpunkt, da dort im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung freie Radikale entstehen. Eine weitere Quelle für oxidativen Stress ist der Neurotransmitter Dopamin, der durch seine Neigung zur Oxidation leicht ROS und Quinone bildet [25].

Darüber hinaus existieren weitere zellimmanente Substanzen, die eine neurotoxische Wirkung entfalten können, wie Glutamat und Kalzium. Glutamat ist an sich nicht giftig, kann jedoch durch exzessive Stimulation glutamaterger Rezeptoren schädlich wirken, was als Exzitotoxizität bezeichnet wird [27]. Die Veränderungen in der Neurotransmission der Basalganglien beim Morbus Parkinson beeinträchtigen auch das glutamaterge System und tragen zur Progression des neurodegenerativen Prozesses bei. Unklar ist, ob es sich dabei um einen weiteren ursächlichen Mechanismus für die Neurodegeneration oder um eine Folge der Störung im dopaminergen System handelt [27]. Diese Exzitotoxizität sowie ein begleitender neuroinflammatorischer Prozess könnten sich dabei gegenseitig im Sinne eines Circulus vitiosus stimulieren und die Neurodegeneration verschlimmern [27]. Auch Kalzium, das in den dopaminergen Neuronen der Pars compacta der Substantia nigra aufgrund deren kontinuierlichen autonomen Generierung von Aktionspotentialen in hoher Konzentration vorliegt [28], beeinträchtigt die mitochondriale Funktion und führt zu vermehrtem oxidativen Stress [29].

Desweiteren sind wohl auch neuroinflammatorische Prozesse an der Neurodegeneration beteiligt [30]. Dabei kommt vor allem der Mikroglia, die toxisch auf die dopaminergen Neurone wirken und sogar das periphere Immunsystem zur Aufrechterhaltung der Entzündung rekrutieren könnte, eine besondere Bedeutung zu [30]. Möglicherweise tragen die Gliazellen über einen sich im Alterungsprozess entwickelnden, kontinuierlich proinflammatorische Zytokine sezernierenden Phänotyp, der auch von Umweltstressoren aufrechterhalten wird, zur Neurodegeneration bei [31]. Eine aktuelle Veröffentlichung hat darüber hinaus gezeigt, dass es sich bei der Multisystematrophie, einer weiteren α -Synucleinopathie, um eine übertragbare Prionenkrankheit handelt. Auch wenn die Untersuchungen zum Morbus Parkinson weniger deutliche Ergebnisse erbrachten, halten die Autoren einen entsprechenden Mechanismus auch hier für möglich [32].

Wie bereits angedeutet, spielt die mitochondriale Dysfunktion eine bedeutende Rolle in diesen komplexen Interaktionen. In diesem Kontext ist auch das Protein Parkin, dessen Einfluss in dieser Arbeit untersucht wird, essentiell, da es über mehrere Mechanismen an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität beteiligt ist. Beide Aspekte werden im Folgenden in eigenen Abschnitten vorgestellt.

1.2. Mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese des Morbus Parkinson

Die Mitochondrien sind an entscheidenden zellulären Prozessen wie ATP-Produktion, Apoptose und Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase beteiligt [4]. Wie bereits einleitend erwähnt, könnte die mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese des Morbus Parkinson eine bedeutende Rolle spielen [4]. Es bestehen zahlreiche Zusammenhänge zwischen mitochondrialer Dysfunktion und sowohl dem idiopathischen als auch dem genetischen Parkinson-Syndrom [33]. Mehrere Mechanismen werden diskutiert, über die mitochondriale Dysfunktion zum Parkinson-Syndrom führen kann. Als mögliche Prozesse gelten unter anderem eine Hemmung des Komplex I der Atmungskette, Veränderungen der mitochondrialen Morphologie, Abnormitäten der Spaltung und Verschmelzung von Mitochondrien, des zellulären Mitochondrien-Transportes und der Mitophagie sowie Zusammenhänge zwischen mitochondrialem Metabolismus und Apoptose [33]. Weitere Auffälligkeiten, die im folgenden Abschnitt detaillierter dargestellt werden, betreffen die mtDNA.

1.2.1. Zusammenhänge zwischen mtDNA und Morbus Parkinson

Ein besonderes Charakteristikum der Mitochondrien ist der Besitz einer eigenen DNA. Die mtDNA wird mütterlich vererbt und kann je nach Zelltyp in hunderten bis einigen tausend Kopien pro Zelle vorliegen [34]. Sie ist etwa 16,6 kb groß und liegt in zirkulärer, doppelsträngiger Form vor. Das DNA-Molekül wird unterteilt in einen leichten und einen schweren Strang, auf denen sich nur wenige nicht-kodierende Abschnitte befinden [34]. Die mtDNA kodiert die 13 Proteine der Atmungskette und 24 für die Translation benötigte Ribonukleinsäuren (RNA). Das Mitochondrium enthält jedoch eine Vielzahl weiterer Proteine. Die Mehrheit davon wird durch nukleäre DNA kodiert und in das Mitochondrium importiert [4].

1.2.1.1. mtDNA-Deletionen

Im Normalfall sind alle mtDNA-Moleküle identisch, was als Homoplasmie bezeichnet wird [4]. Die DNA kann jedoch mutieren, vermutlich ist die Mutationsrate der mtDNA sogar höher als die der nukleären DNA [34]. Für das Auftreten von Mutationen werden vor allem die bei der oxidativen Phosphorylierung entstehenden ROS verantwortlich gemacht, die in räumlich enger Beziehung zur mtDNA stehen [34]. Lange war man der Ansicht, dass die mtDNA auch durch ein unzureichendes DNA-Reparatursystem und den fehlenden Schutz durch Histone zu vermehrten Mutationen neigt. Es zeigt sich jedoch zunehmend, dass die Reparaturmechanismen der Mitochondrien effizienter sind als zunächst angenommen [35]. Mutationen kommen gewöhnlich nicht in allen Kopien vor,

vielmehr existieren in einem Mitochondrium gesunde und mutierte mtDNA-Moleküle nebeneinander, es liegt also Heteroplasmie vor [4]. Da die mitochondrialen Gene ausnahmslos für Proteine der Atmungskette kodieren, führen Mutationen der mtDNA zu Defekten der Atmungskette und resultieren letztendlich in mitochondrialer Dysfunktion [36]. Zur Auslösung von mitochondrialer Dysfunktion und deren klinischer Manifestation muss der Anteil an mutierter mtDNA einen gewissen Grenzwert überschreiten, der in Geweben mit vermehrter Abhängigkeit von oxidativem Metabolismus wie Gehirn und Herz niedriger ist (s. Abb. 1.2.) [4].

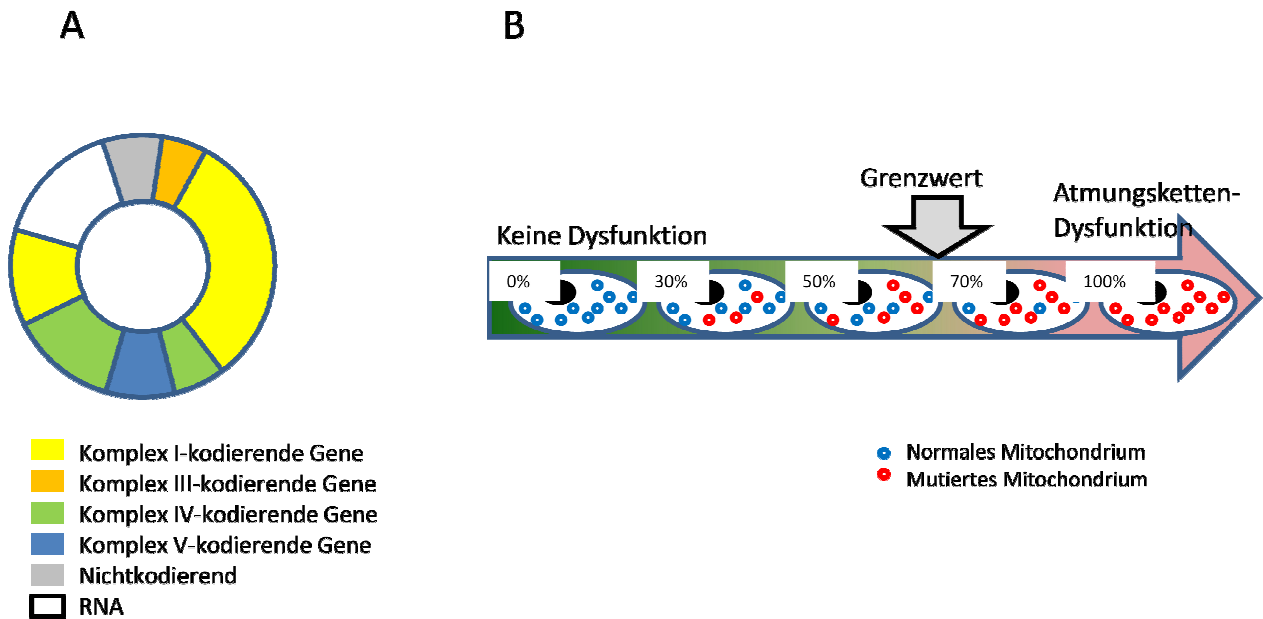


Abb. 1.2. (modifiziert nach [4]): Darstellung der mtDNA mit ihren 37 Genen (A). Entstehung von Atmungsketten-Dysfunktion durch Zunahme der Heteroplasmie über einen tolerierten Grenzwert (B).

Die Grenze für die klinische Manifestation mutierter mtDNA ist abhängig von der Art der Mutation. Sie liegt bei einem Anteil von etwa 50-60 % für Deletionen, bei einigen Punkt-Mutationen der tRNA-kodierenden Bereiche können bis zu 85 % mutierter mtDNA toleriert werden [34].

Typische Krankheiten, die durch diese Mutationen ausgelöst werden, sind primäre Mitochondriopathien wie MELAS, ein Syndrom mit den Leitsymptomen mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden, und das Kearns-Sayre-Syndrom. Außerdem akkumulieren mtDNA-Mutationen mit dem natürlichen Alterungsprozess und werden häufig in Malignomen gefunden [36].

Darüber hinaus ist die Rolle der mtDNA-Mutationen in neurodegenerativen Erkrankungen Gegenstand der Forschung [36]. In Neuronen der Substantia nigra von Parkinson-Patienten sowie von älteren Menschen wurden vermehrt mtDNA-Deletionen gefunden [37-39]. Transfektion von mtDNA, die aus Blutplättchen von Parkinson-Patienten gewonnen wurde, führt in Zellkulturen zu Defekten des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und weiteren zellulären Pathologien

[40] und enthält folglich möglicherweise eine für die Mitochondrien pathogene Information [4]. In einem Mausmodell führte ein Defekt von TFAM, dem Transkriptionsfaktor für mtDNA, zu einem Parkinson-Syndrom mit dysfunktionaler Atmungskette [41]. Mutationen der nukleär kodierten POLG1, einem Reparaturenzym, auf das im nächsten Absatz noch näher eingegangen werden wird, sind mit Parkinson und komplexeren Syndromen assoziiert und führen zu Akkumulation von mtDNA-Deletionen und Verlust von Neuronen der Substantia nigra [42]. Darüber hinaus gibt es noch weitere Untersuchungen, die Assoziationen zwischen mtDNA-Mutationen und dem Morbus Parkinson aufgedeckt haben [23].

1.2.1.2. mtDNA-Kopienzahl

Wie bereits erwähnt, existieren in einer Zelle mehrere hundert bis tausend Kopien der mtDNA [43]. Die mtDNA-Kopienzahl ist abhängig vom Energiebedarf der Zelle und gewebespezifisch variabel [43]. In Neuronen finden sich etwa 1.200-10.800 Kopien [44], in der Leber können bis zu 25.000 mtDNA-Moleküle vorkommen [45]. In der Kontrolle der mtDNA-Kopienzahl nehmen die Regulatoren PGC-1 α , NRF-1 und NRF-2 eine wichtige Position ein [46]. PGC-1 α fungiert als Aktivator von Transkriptionsfaktoren wie NRF-1 und NRF-2, die wiederum stimulierend auf diverse für Replikation, Transkription und Translation der mtDNA relevante Gene wie den mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM wirken [46].

Klinisch relevant wird die Reduktion der mtDNA-Kopienzahl bei den sogenannten mtDNA-Depletions-Syndromen. Dabei handelt es sich um schwere pädiatrische Erkrankungen, die in myopathische, enzephalomyopathische und hepatozerebrale Formen eingeteilt werden [47]. Sie sind charakterisiert durch eine Reduktion der mtDNA-Kopienzahl auf unter 35-40 %, manchmal sogar auf etwa 1-2 %, des Normalwerts. Ursächlich für diese Krankheiten sind Mutationen von Genen, die für verschiedene Enzyme, unter anderem POLG1, kodieren [47]. POLG1 ist ein nukleär kodiertes Gen, das in den Mitochondrien als DNA-Polymerase, 3'-5'-Exonuklease und 5'-dRP-Lyase fungiert und als solche an der DNA-Replikation und -Reparatur beteiligt ist [48]. Mutationen von POLG1 gehören zu den häufigsten Gründen für mitochondriale Erkrankungen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen. Sie präsentieren heterogene klinische Manifestationen wie Enzephalopathie, Leberversagen, Ataxie u.v.m. [47].

In mehreren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen POLG1-Mutationen und Syndromen, die auch Parkinson-Symptomatik beinhalteten, berichtet [42, 49]. Darüber hinaus wurden in Zellkulturen, in denen die mtDNA von Parkinson-Patienten exprimiert wurde, reduzierte Level von mtDNA gefunden [50]. In einem Mausmodell mit Knockout von TFAM zeigte sich, dass die Tiere neben der Parkinson-Symptomatik auch eine Reduktion der mtDNA-Expression und eine mtDNA-Depletion entwickelten [41]. Somit erscheint es plausibel, dass auch eine Störung der mitochondrialen Biogenese an der Pathogenese des Morbus Parkinson beteiligt sein kann.

1.3. Parkin

1.3.1. Physiologische Funktion

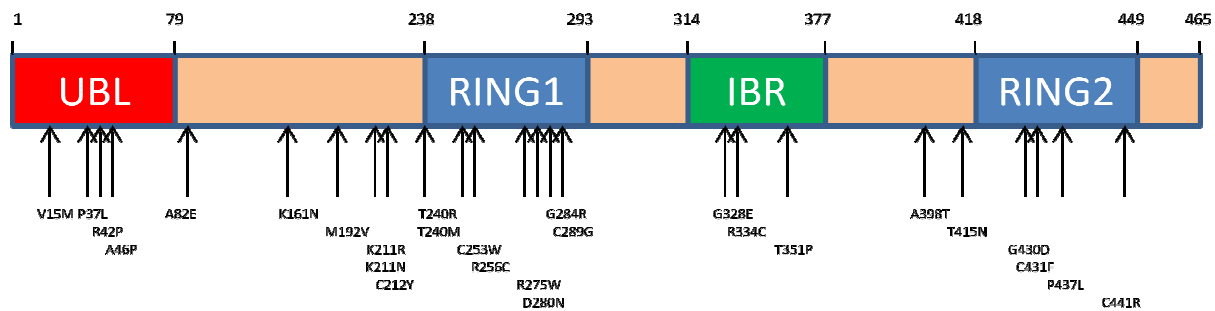


Abb. 1.3. (modifiziert nach [26]): Darstellung von Parkin mit seinen Domänen und bekannten Mutationen.

Parkin ist ein 465 Aminosäuren langes Protein (s. Abb. 1.3.), das durch das PARK2-Gen kodiert wird [33]. Dieses Gen enthält 12 Exons und ist wohl aufgrund seiner Größe von 1,3 Mb besonders anfällig gegen Mutationen [51], von denen derzeit etwa 200 bekannt sind [33]. Biochemisch gesehen handelt es sich bei Parkin um eine E3 Ubiquitin-Protein-Ligase, an deren C-Terminus sich eine für Ubiquitin-Ligasen charakteristische RBR-Struktur, bestehend aus einer RING I-, IBR- und RING II-Domäne, befindet [33]. Parkin ist überwiegend zytosolisch, teilweise jedoch auch in Zellorganellen wie beispielsweise der Mitochondrienmembran, lokalisiert [33]. Bei Anzeichen mitochondrialer Schädigung wird Parkin spezifisch an die defekten Mitochondrien mobilisiert [52]. Parkin nimmt in seiner Funktion als E3 Ubiquitin-Protein-Ligase an der Proteindegradation über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) teil [33]. Ubiquitin ist ein Protein mit einer Länge von 76 Aminosäuren, das Proteine unter anderem für die Degradation kennzeichnet, indem es sie durch Bildung von Polyubiquitinketten markiert und dem Abbau durch 26S-Proteasome zuführt [53]. E1-Proteine aktivieren Ubiquitin und binden es an das Ubiquitin-Trägerprotein E2. E3-Proteine wie Parkin verbinden Ubiquitin mit dem Zielprotein und gewährleisten Substratspezifität [53], wobei Parkin in diesem Rahmen mit vielen verschiedenen Proteinen als Substrat interagiert [26]. E4-Proteine können die Verbindung verschiedener Ubiquitinmoleküle untereinander über Lysin-Reste in Position 48 und 63 vermitteln, so dass an den Zielproteinen neben einer Monoubiquitinierung auch zwei verschiedene Arten von Polyubiquitinierung vorliegen können [54]. Jede Art der Ubiquitinierung hat eine andere Funktion. Eine Polyubiquitinierung über Lysin in Position 48 ist das Signal für Proteindegradation [54], Polyubiquitinierung über Lysin in Position 63 reguliert ebenso wie die Monoubiquitinierung andere zelluläre Prozesse, beispielsweise Proteintransport, Transkription und die DNA-Reparatur [33]. Darüber hinaus beeinflusst die Monoubiquitinierung auch den Rezeptorumsatz [54]. Parkin katalysiert normalerweise Lysin-48-Polyubiquitinierungen, kann jedoch auch Mono- und Lysin-63-Polyubiquitinierungen ermöglichen [33]. Neben seiner Rolle im UPS ist Parkin an der Erhaltung der Mitochondrien und dem Schutz der zellulären Integrität beteiligt [33], die Mechanismen hierfür werden im Kap. 1.3.3. beschrieben. Dabei kooperiert es mit einem anderen Parkinson-assoziierten Gen, PINK1 [55, 56], das in den gleichen Stoffwechselwegen wie Parkin agiert [57].

1.3.2. Parkin-assoziiertes Parkinson-Syndrom

1.3.2.1. Genetik

Parkin wurde erstmals vor etwa 15 Jahren beschrieben und als Auslöser eines familiären Parkinson-Syndroms in einer japanischen Familie erkannt [58]. Mutationen des Parkin-Gens verursachen einen frühen Erkrankungsbeginn mit einem Erkrankungsalter unter 40 Jahren und sind der zweithäufigste Grund der genetischen L-Dopa-sensitiven Form der Erkrankung [3]. Daneben spielt Parkin auch bei der idiopathischen Form der Erkrankung eine Rolle. Derzeit sind laut Website <http://www.molgen.ua.ac.be/PDmutDB>, auf der in einer Datenbank alle Mutationen von Parkin gesammelt werden, etwa 200 Mutationen bekannt, darunter Punktmutationen, Insertionen, Deletionen und Multiplikationen [33]. Diese Mutationen sind über das ganze Gen verteilt und sowohl in vererbten als auch idiopathischen Fällen anzutreffen [59]. Homozygote krankheitsverursachende Mutationen beider Allele führen ebenso wie eine Compound-Heterozygotie für Mutationen zum Ausbruch der Erkrankung [60]. Zur Rolle isolierter heterozygoter Mutationen gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Manche Studien berichten von einer größeren Häufigkeit bei Parkinson-Patienten, während andere keinen Unterschied zwischen Erkrankten und Kontrollgruppen finden [60, 61].

1.3.2.2. Pathophysiologie und neuropathologische Befunde

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, über welchen Pathomechanismus die Mutationen zur Neurodegeneration führen. Initial wurde der Funktionsverlust der enzymatischen Aktivität durch die Mutation als Ursache postuliert, infolgedessen es zu einer Störung der proteasomalen Degradation und einer pathologischen Protein-Akkumulation käme [62]. Die einzelnen Mutationen unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften wie intrazellulärer Lokalisierung, Affinität zu Substraten und enzymatischer Aktivität [62]. Manche Mutationen akkumulieren und verändern ihre Lokalisierung innerhalb des Zytoplasmas. Andere zeigen eine vermehrte enzymatische Aktivität und ineffizienten Transport zum Proteasom oder verminderte Substratbindung und enzymatische Aktivität [62]. Unter anderem ist auch entscheidend, an welcher Stelle des Parkin-Proteins sich die Mutation befindet. Deletionen am C-terminalen Ende weisen eine mangelnde Interaktion mit der Zellmembran sowie die Neigung zur Fehlfaltung mit konsekutiver Aggregation auf, während Missense-Mutationen am N-Terminus in einer schnellen Degradation durch Proteasomen resultieren [63]. Weiterhin setzt der Austausch von Cystein durch andere Aminosäuren die Löslichkeit von Parkin herab und macht das Protein empfindlicher gegen Stress, wobei das Ausmaß der Schädigung entscheidend davon abhängt, an welcher Stelle sich das ausgetauschte Cystein befindet [64]. Durch die Untersuchung von Tiermodellen, Zellkulturen und Gewebe von Patienten richtet sich das Augenmerk auf einen weiteren Erklärungsansatz, nämlich die Rolle Parkins in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität [33].

Die histopathologischen Befunde des Parkin-assoziierten Parkinson-Syndroms unterscheiden sich von denen des idiopathischen Morbus Parkinson. Zwar kommt es auch hier zur

Neurodegeneration der Pars compacta der Substantia nigra und einer reaktiven Gliose [65], im Gegensatz zum idiopathischen Morbus Parkinson ist jedoch der Locus coeruleus weniger betroffen [66]. Auch die typischen Lewykörper wurden teils nicht gefunden [65], es gibt allerdings auch Berichte von Fällen mit Lewykörpern [67]. In einem Fall wurden α -Synuclein-positive Einschlüsse gefunden, dabei handelte es sich jedoch nicht um klassische Lewykörper [68]. In zwei Untersuchungen konnten auch neurofibrilläre Tangles und τ -positive Astrozyten nachgewiesen werden. Insgesamt zeigen sich auf neuropathologischer Ebene beim Parkin-abhängigen Parkinson-Syndrom sehr variable Befunde [66]. Einen Überblick über die histopathologischen Befunde bietet Tab. 1.1. [66].

Tab. 1.1. (modifiziert nach [66]): Zusammenfassung der histopathologischen Befunde beim Parkin-abhängigen Parkinson-Syndrom

| Autor | Verteilung des Zelluntergangs | Lewykörper- und Lewyneuriten-Pathologie | Tau-Pathologie NFT-Stadium | Andere Zelleinschlüsse |
|-------------------------|-------------------------------|---|----------------------------|--|
| Yamamura 1996 | SNpc > LC | -- | -- | -- |
| Mori 1998 | SNpc > LC | -- | III | Dornförmige Astrozyten |
| Hayashi 2000 | SNpc > SNpr, LC | -- | vereinzelt | -- |
| Van der Warrenburg 2001 | SNpc > LC | -- | -- | Dornförmige Astrozyten |
| Mori 2003 | SNpc > LC | -- | -- | -- |
| Gouider-Khouja 2003 | SNpc, SNpr > LC | -- | -- | -- |
| Farrer 2001 | SNpc, LC | + | -- | -- |
| Pramstaller 2005 | SNpc, LC | + | -- | -- |
| Sasaki 2004, 2008 | SNpc > LC | Basophile Lewykörper-ähnliche Pathologie in PPN | -- | Eosinophile Lewykörper in Vorderhornzellen |

Abkürzungen: SNpc/pr = Substantia nigra pars compacta/reticulata; LC = Locus coeruleus; PPN = Ncl. pedunculopontinus; NFT = Neurofibrilläre Tangles

1.3.2.3. Klinische Charakteristika

Das Parkin-assoziierte Parkinson-Syndrom ist charakterisiert durch einen frühen, häufig symmetrischen Krankheitsbeginn, langsame Progredienz und gutes Ansprechen auf Therapie mit L-Dopa, die jedoch frühzeitig zu Dyskinesien führt. Es ist gelegentlich von einer Dystonie der Extremitäten begleitet, dementielle Begleitsyndrome werden kaum beobachtet [3]. Ebenso treten selten Hyposmie und Bulbärsymptomatik auf, wohingegen bereits relativ bald Verhaltensstörungen festgestellt werden können [3]. Parkin-Mutationen sind neben dem Parkinson-Syndrom noch in anderen neurologischen Erkrankungen beschrieben wie bei einer gemeinsamen Manifestation von Parkinson-Syndrom und essentiellen Tremor sowie bei Patienten mit Restless-legs-Syndrom [69, 70].

1.3.3. Interaktionen von Parkin und mitochondrialem Metabolismus

Parkin ist in verschiedene zelluläre Abläufe involviert, die mit dem Metabolismus der Mitochondrien zusammenhängen. Dazu gehören die Spaltung und Verschmelzung der Mitochondrien, deren Transport über das Mikrotubulussystem, die Eliminierung mittels Mitophagie und die Kontrolle der Biogenese [33].

Parkin ist an zwei Prozessen, die wichtig für die Erhaltung der mitochondrialen Funktionsfähigkeit sind, beteiligt, der Spaltung eines Mitochondriums in mehrere (Fission) und der Verschmelzung mehrerer Mitochondrien zu einem (Fusion) [33]. Parkin reguliert dabei den Metabolismus der Fusionsproteine MFN1, MFN2 und DRP1 [71, 72]. Dadurch könnte es zu einem Überwiegen der Fission und einer Hemmung der Fusion kommen, weshalb immer mehr, allerdings kleinere Mitochondrien entstehen [73]. Dies erleichtert die Mitophagie, also die Eliminierung dysfunktionaler Mitochondrien, die einen wichtigen Teil der mitochondrialen Qualitätskontrolle darstellt [74]. Der genaue Mechanismus ist noch nicht verstanden, jedoch gilt es als gesichert, dass Parkin über die Regulation von Fusion und Fission in die mitochondriale Dynamik eingreift, was einen potentiellen Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und Neurodegeneration darstellt [33].

Desweiteren geht Parkin über mehrere Domänen starke Bindungen mit α - und β -Tubulin ein und interagiert so mit dem Mikrotubulus-System [33]. In Zellkulturen von Fibroblasten von Patienten mit Parkin-Mutationen konserviert die Überexpression von Parkin die Funktion des Mikrotubulus-Systems, das für die Verteilung von Mitochondrien innerhalb der Neurone verantwortlich ist [33]. Möglicherweise handelt es sich also bei Parkin um einen wichtigen Regulator der mitochondrialen Mobilität, der auf diese Weise defekte Mitochondrien der Elimination durch Mitophagie zuführt [33]. Bei der Mitophagie handelt es sich um die Degradation defekter Mitochondrien durch Autophagosomen, einem wichtigen Prozess der Qualitätskontrolle [4]. Es gibt mehrere Stadien der Qualitätskontrolle. Das erste Stadium umfasst die Verhinderung des oxidativen Stress' und mitochondrialer Schäden. Kommt es trotzdem zu Schädigungen, erfolgt in einem zweiten Stadium die Degradation defekter Proteine durch Proteasen und das UPS [75]. Wenn auch diese Mechanismen nicht ausreichen, kommt es im dritten Stadium bei schwerer Dysfunktion zur Fission und Entfernung der geschädigten Mitochondrien durch Mitophagie [75]. Dabei werden die zu degradierenden Mitochondrien in Autophagosomen eingeschlossen, woraufhin diese mit Lysosomen fusionieren, in denen die Degradation stattfindet [4]. Parkin transloziert zu Mitochondrien, wenn diese ihr Membranpotential verlieren, was ein Zeichen für die Dysfunktionalität des Mitochondriums ist, und begünstigt die Kollokalisierung von Mitochondrien und Autophagosomen [52]. Es führt zu deren Degradation mittels Mitophagie [52] und ist somit an der mitochondrialen Qualitätskontrolle beteiligt [74].

Neben diesen Interaktionen ist Parkin auch an der Regulation der mitochondrialen Biogenese und der mtDNA beteiligt. Überexpression von Wildtyp-Parkin stimuliert die mtDNA-Transkription und -Replikation, während Parkin-Mutationen diese Prozesse stören [76]. Parkin könnte über mehrere Mechanismen die mitochondriale Transkription und Replikation erhöhen [33]. Zum einen ist eine

direkte Stimulation denkbar, andererseits könnte es indirekt über die Regulation von Proteinen der Biogenese und nukleären Genen, die die mitochondriale Physiologie kontrollieren, wirken [33]. Eine Möglichkeit der indirekten Stimulation ist die Interaktion mit TFAM, einem wichtigen Faktor der mtDNA-Transkription. In dessen Anwesenheit bindet Parkin mtDNA und stimuliert die Transkription der mtDNA-Promoter LSP und HSP [77]. Darüber hinaus sind TFAM und Parkin wohl an der Erkennung und Reparatur nukleärer und mitochondrialer DNA-Schäden beteiligt [76]. Neben TFAM ist auch das Protein PARIS, ein negativer Regulator von PGC-1 α , ein wichtiger Interaktionspartner von Parkin. Durch die artifizielle Inaktivierung von Parkin erhöht sich die Konzentration von PARIS, wodurch die Transkription von PGC-1 α gehemmt wird. Simultan wurde eine Reduktion von NRF-1 beobachtet [78]. Dieses ist ein wichtiger Regulator der Mitochondrien auf mehreren Ebenen und ist neben der Beteiligung an der Expression von Untereinheiten der Atmungsketten an der Aktivierung mitochondrialer Transkriptionsfaktoren und nukleärer Gene involviert [46]. Es wurden eine Reihe weiterer Interaktionen gefunden, die auch als mögliche Ziele einer antineurodegenerativen Therapie identifiziert wurden [33]. Diese Zusammenhänge könnten für den Morbus Parkinson pathogenetisch bedeutsam sein. PARIS akkumuliert in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten und wird in Parkin-Knockout-Mäusen hochreguliert, woraufhin es zum Untergang dopaminergener Neurone kommt [78]. Übereinstimmend dazu zeigt sich in einer Metaanalyse des Genoms von Parkinson-Patienten eine Erniedrigung von PGC-1 α -abhängigen Genen [79].

1.3.4. Parkin-Tiermodelle des Morbus Parkinson

In einem idealen Tiermodell des Morbus Parkinson sollte ein altersabhängiger, progredienter Untergang dopaminergener Neurone stattfinden, der zu einer Motorikstörung führt, die sich nach L-Dopa-Gabe bessert, und neuropathologisch von Lewykörpern mit α -Synuclein-Einschlüssen und Ubiquitin-Proteasom-Proteinen begleitet ist [51]. Bisher konnten keine Knockout-Modelle generiert werden, die alle diese Charakteristika aufweisen [80].

1.3.4.1. Parkin-Mausmodelle

In mehreren Knockout-Modellen wurden geringe Auffälligkeiten des Verhaltens und der dopaminergen Neurotransmission gezeigt, teilweise wurden Störungen des noradrenergen Systems im Locus coeruleus beobachtet, jedoch konnte kein Untergang dopaminergener Neurone nachgewiesen werden [81, 82]. In einem weiteren Modell zeigten die Tiere mitochondriale Dysfunktion und oxidative Schädigung ohne Degeneration dopaminergener Neurone [83]. Ein progredienter Zelluntergang in der Substantia nigra konnte erst in einem neueren Knockout-Modell nachgewiesen werden [78]. Dabei wurden auf molekularer Ebene eine Akkumulation von PARIS, eine Reduktion von PGC-1 α -mRNA sowie mitochondriale Dysfunktion gefunden [78]. Neben reinen Parkin-Knockout-Modellen wurden auch Tiermodelle mit kombiniertem Knockout von Parkin, PINK1 und DJ1 generiert, die ebenso wie die meisten isolierten Parkin-Knockout-Modelle keinen degenerativen Prozess entwickelten [84]. Die Expression einer human-pathogenen Mutante führte

im Mausmodell klinisch zu progredienten, hypokinetischen Defiziten der Motorik und zeigte neuropathologisch eine Degeneration dopaminerger Neurone mit Akkumulation von α -Synuclein [85]. Eine Überexpression von Wildtyp-Parkin konnte die Toxizität von MPTP abmildern und verbesserte das Überleben dopaminerger Neurone sowie die mitochondriale Funktionsfähigkeit nach Exposition der Mäuse gegenüber diesem Nervengift [86].

1.3.4.2. Parkin-Drosophilamodelle

Ebenso wurden diverse Drosophila-Modelle generiert, in denen sich insgesamt auffälligere Befunde ergaben. Der Knockout von Parkin führte dort zu diversen Pathologien wie mitochondrialer Dysfunktion, Apoptose in Muskeln und defekter Spermiendifferenzierung, Unfruchtbarkeit, reduzierter Lebenserwartung und Defiziten beim Fliegen und Klettern [87, 88]. Es wurde auch eine Degeneration dopaminerger Neurone beobachtet [89]. Neben Knockout-Tieren gibt es auch Tiermodelle, die eine human-pathogene Mutation von Parkin überexprimieren. Diese verursacht eine Degeneration dopaminerger Neurone und teilweise auch motorische Defizite und mitochondriale Dysfunktion [90, 91]. Eine Überexpression humanen Wildtyp-Parkins hingegen hat in Tieren mit PINK1-Mutationen eine protektive Wirkung und machte die durch die PINK1-Mutationen hervorgerufenen Auffälligkeiten wieder rückgängig [55, 56]. Auch in Tieren, deren Genotyp bis auf die Parkin-Überexpression unverändert ist, wirkt Parkin positiv und erhöht die Lebenserwartung bei vermehrter motorischer Aktivität. Auf molekularer Ebene zeigte sich hier eine reduzierte Aggregation von Proteinen und eine Verbesserung der mitochondrialen Aktivität [92].

2. Zielsetzung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt, könnte die mtDNA einerseits ein wichtiger Baustein in der Pathogenese des Morbus Parkinson sein, andererseits unterliegt sie der Regulation durch Parkin. Da man sich von einem besseren Verständnis der Pathomechanismen der Neurodegeneration neue Therapieansätze erhofft, ist es von großem Interesse, die Zusammenhänge zwischen Parkin und mtDNA zu erforschen.

Diese Arbeit sollte folgende Fragen beantworten:

1. Haben verschiedene Parkin-Expressionsmuster einen Einfluss auf die Häufigkeit von Deletionen der mtDNA?
2. Beeinflussen verschiedene Parkin-Expressionsmuster die Kopienzahl der mtDNA?
3. Beeinflussen verschiedene Parkin-Expressionsmuster die Expression charakteristischer mitochondrialer Proteine?

Diese Fragestellungen wurden mit folgendem prinzipiellen experimentellen Ansatz bearbeitet: Es wurde Gewebe aus verschiedenen Hirnregionen (Substantia nigra, Hippocampus, Bulbus olfactorius) von Mäusen mit unterschiedlichem Parkin-Expressionsmuster und unterschiedlichem Alter gewonnen. Für die Gewinnung von Neuronen der Substantia nigra und des Hippocampus wurden histologische Schnitte angefertigt und mittels Lasermikrodissektion die Neurone aus dem Gewebeverband herausgelöst. Nach Isolierung der DNA erfolgte die Amplifizierung mitochondrialer Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hieraus wurden die Häufigkeit von Deletionen sowie die Kopienzahl der mtDNA berechnet. Zur semiquantitativen Bestimmung mitochondrialer Proteine wurde nach Isolierung der Proteine aus Gewebehomogenat des Bulbus olfactorius die Menge des mitochondrialen Membran-Proteins VDAC im Western Blot bestimmt.

3. Material und Methoden

Zunächst wird die Gewinnung von DNA aus Frontalpolhomogenat, Hippocampus und Substantia nigra beschrieben. Dazu wurden histologische Schnitte angefertigt und gefärbt, um mikroskopisch die Zielregionen in Hippocampus und Substantia nigra zu identifizieren und mittels Lasermikrodissektion aus dem Gewebeverband lösen zu können. Anschließend wurde die DNA aus den Zellen isoliert und in einer realtime-PCR amplifiziert. Durch Bestimmung der C_T -Werte in der PCR und auf Grundlage von Rechenmodellen mit diesen C_T -Werten wurde die relative Anzahl von Deletionen der mtDNA (im Folgenden Deletionsgrad genannt) sowie der mtDNA-Kopienzahl bestimmt. Aus dem Frontalpolhomogenat wurden auch Proteine gewonnen, die anschließend im Western Blot untersucht wurden. Dabei erfolgte die Detektion der Proteine Actin- β als Ladekontrolle und VDAC als ubiquitär vorhandenem mitochondrialen Membranprotein, wodurch man Rückschlüsse auf die Anzahl der Mitochondrien ziehen kann.

3.1. Verwendetes Tiermodell

Insgesamt standen die Gehirnproben von 69 Mäusen zur Verfügung. Das Alter der Mäuse betrug zwischen 2 und 12 Monaten, es lagen 4 verschiedene Parkin-Genotypen vor:

1. Wildtyp
2. Wildtyp mit zusätzlicher Expression von humanem Parkin
3. Knockout
4. Human-pathogene Stop-Mutation

Tab. 3.1. gibt einen nach Genotyp und Alter aufgegliederten Überblick über die Anzahl der untersuchten Tiere.

Tab. 3.1.: Anzahl der Tiere

| Genotyp | Alter der Tiere | | |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| | 2 Monate | 9 Monate | 12 Monate |
| Wildtyp | 3 | 15 | 16 |
| Expression von humanem Parkin | | 4 | 6 |
| Knockout | 3 | 7 | 6 |
| Human-pathogene Stop-Mutation | | 5 | 4 |

Es erfolgte die Untersuchung verschiedener Genotypen, um sowohl den Effekt einer übermäßigen Parkin-Expression als auch des Vorliegens einer mutierten Form sowie der Abwesenheit von Parkin beurteilen zu können. Um eine Dynamik der Befunde im Laufe des Lebens erkennen zu können, wurden die Tiere in verschiedenen Altersgruppen untersucht.

Tab. 3.2.: Allgemeine Materialien

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|--|--|----------------|
| Eppendorf Centrifuge 5415 R | 5426000.018 | Eppendorf |
| Thermomixer compact | 5350 | Eppendorf |
| Mini Rocker MR-1 | N042063 | PeqLab |
| Safe-Lock Gefäße™: 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml | 0030121.023, 0030120.086, 0030120.094 | Eppendorf |
| BD Falcon™ Conical Tubes: 50 ml | 352070 | BD Biosciences |
| PIPETMAN Classic™ Pipetten: P2 - P1000 | F144801, F144802, F123600, F123615, F123601, F123602 | Gilson |
| MultiFlex Pipettenspitzen 0,5-200 µl | 81-13790 | PeqLab |
| TipOne® Pipette Tips: 10 µl Graduated Tip, 20 µl Micro Tip, 200 µl Yellow Tip, 1000 µl Blue, Graduated Tip | S1111-3700 S1111-4800 S1111-0706 S1111-2721 | Starlab |
| Ethanol 100% | 100983 | Merck |
| TWEEN® 20 | P2287 | Sigma-Aldrich |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 (10x) | 70011-036 | Invitrogen |

3.2. DNA-Isolation

3.2.1. Anfertigung histologischer Schnitte

Die bei -80°C eingefrorenen Gehirne wurden zur Verbesserung der Schnittqualität zunächst für eine Stunde bei -20°C gelagert. Bei dieser Temperatur erfolgte auch nach Entfernung des Kleinhirns die Anfertigung von Koronarschnitten auf Höhe des Hippocampus und der Substantia nigra von kaudal nach rostral unter Orientierung mithilfe eines anatomischen Atlas´ [93]. Es wurden mittels Kryostat jeweils etwa 10 Schnitte mit einer Dicke von 10 µm von insgesamt 18 Tieren angefertigt. Diese wurden auf Membranobjektträger gezogen, die zur Weiterverwendung durch die Lasermikrodissektion geeignet sind, und bei -20°C gelagert.

Tab. 3.3.: Materialien für Anfertigung histologischer Schnitte

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|--|---------------|--------------------|
| Leica Membrane slides PEN-Membran 2,0 µm | 11505158 | Micro Dissect GmbH |
| Kryostat 2800 Frigocut | - | Reichert-Jung |

3.2.2. Färbungen

Anschließend wurden die Schnitte mit zwei verschiedenen Techniken gefärbt. Bei einem Teil der Schnitte wurde die Nissl-Färbung, mit deren Hilfe die einzelnen Regionen des Hippocampus identifiziert wurden, angewandt, beim anderen Teil die Anti-Tyrosin-Hydroxylase(TH)-Färbung, die zur Erkennung der Neurone in der Substantia nigra dient.

3.2.2.1. Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung ist eine histologische Färbemethode, die vor allem zur Darstellung von Nervengewebe verwendet wird. Der basische Farbstoff Cresylviolett bindet an negativ geladene Verbindungen wie RNA und DNA, wodurch Zellkern, Ribosomen und endoplasmatische Retikula kenntlich gemacht werden. Im Nervengewebe werden damit vor allem die Somata angefärbt und sind deshalb besonders gut zu identifizieren, die Nervenzellfortsätze sind mit dieser Technik nicht darstellbar (s. Abb. 3.1.) [94].

Tab. 3.4.: Materialien für Nissl-Färbung

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|-----------------|---------------|---------------|
| Essigsäure 100% | 137000 | Merck |
| Natriumacetat | 106268 | Merck |
| Cresylviolett | C5042 | Sigma Aldrich |

Protokoll der Nissl-Färbung:

1. Herstellung von Acetat-Puffer: 800 ml destilliertes Wasser mit 9,6 ml 100%iger Essigsäure und 5,44 g Natriumacetat mischen, dann mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
2. Herstellung der Färbelösung: 100 ml Acetat-Puffer und 0,5 g Cresylviolett mischen. Gefäß mit Aluminiumfolie lichtgeschützt verschließen und über Nacht Färbelösung auf einem Magnetrührer vermischen
3. Inkubation der Schnitte in Nissl-Färbelösung für 5 Minuten
4. Inkubation in Acetat-Puffer für 90 Sekunden
5. Inkubation in destilliertem Wasser für 1 Minute
6. Inkubation in 70%igem Alkohol für 2 Minuten
7. Inkubation in 100%igem Alkohol für 2 Minuten
8. Abwaschen mit destilliertem Wasser und Abwischen der Schnitte

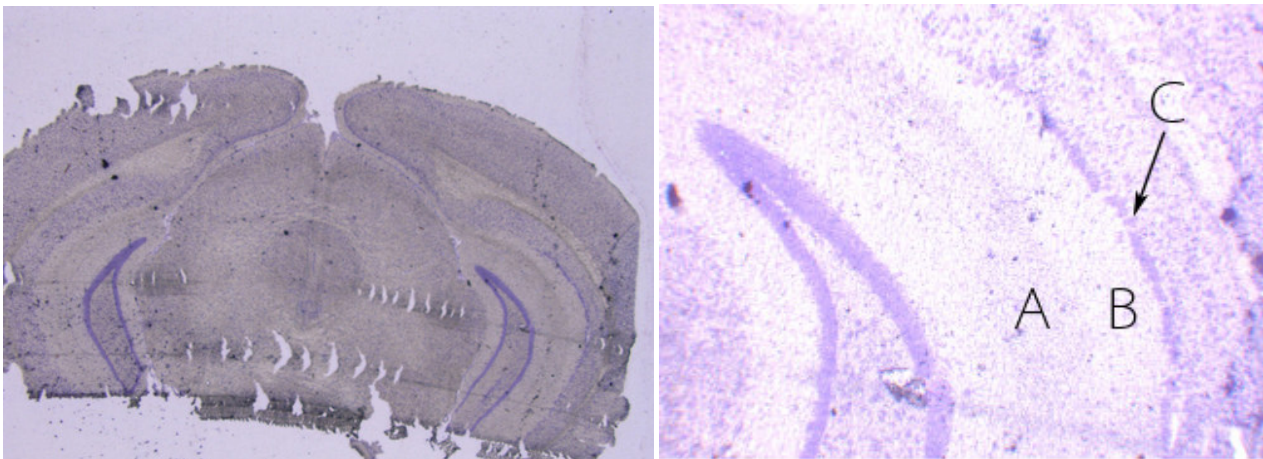


Abb. 3.1.: Koronarschnitt des Gehirns, Nissl-Färbung: Links Übersichtsaufnahme (1,25x vergrößert), rechts Nahaufnahme des Hippocampus (6,3x vergrößert). Man erkennt die Strata radiatum (A), lacunosum moleculare (B) und pyramidale (C).

3.2.2.2. Anti-TH-Färbung

Mithilfe immunohistochemischer Markierung des Enzyms TH können katecholaminerge Neurone angefärbt werden. Diese umfassen neben den dopaminergen auch die adrenergen und noradrenergen Neurone. Da jedoch die Substantia nigra fast ausschließlich aus dopaminergen Neuronen besteht, können diese als selektiv angefärbt betrachtet werden [95]. Zunächst werden die Schnitte mit einem primären Antikörper gegen die TH inkubiert, in einem zweiten Schritt wird ein sekundärer, gegen den primären gerichteter Antikörper hinzugefügt. Dieser enthält das Enzym Meerrettich-Peroxidase, welches Diaminobenzidin oxidiert und dadurch braun anfärbt (s. Abb. 3.2.) [96]. Um die Qualität der DNA nicht negativ zu beeinflussen, wurden Protokolle mit kurzen Inkubationszeiten gewählt, die schlechtere Darstellung der Morphologie wurde bewusst in Kauf genommen. Weiterhin ist bei der Beurteilung der Qualität der histologischen Abbildung zu bedenken, dass die Morphologie aufgrund der verwendeten Membranobjektträger für die Lasermikrodissektion prinzipiell undeutlicher ausfällt als bei vergleichbaren Standard-Glas-Objektträgern.

Tab. 3.5.: Materialien für Anti-TH-Färbung

| Material | Produktnumme | Hersteller |
|--|--------------|------------|
| Aceton | 822251 | Merck |
| Anti-tyrosine hydroxylase antibody | ab152 | Chemicon |
| Anti-Rabbit Poly HRP IHC Detection Kit | 2770 | Millipore |
| Formaldehyd | 100496 | Merck |

Protokoll der Anti-TH-Färbung:

1. Fixierung der Schnitte in -20°C kaltem Aceton für 30 Sekunden
2. 5-10 Minuten trocknen lassen
3. 3x mit PBS-T waschen
4. Inkubation in 4%igem Formaldehyd für 1 Minute
5. 3x mit PBS-T waschen

6. Blocken mit ready-to-use Peroxidase Blocking Solution für 5 Minuten
7. 3x mit PBS-T waschen
8. Inkubation mit primärem Antikörper für eine Stunde
9. 3x mit PBS-T waschen
10. Inkubation mit ready-to-use Anti-Rabbit poly HRP für 30 Minuten
11. 3x mit PBS-T waschen
12. Inkubation mit DAB-Chromogen-Buffer solution (25µl DAB und 1 ml DAB Buffer) für 25 Minuten
13. 3x mit PBS-T waschen
14. Inkubation in 80%igem Alkohol für 30 Sekunden

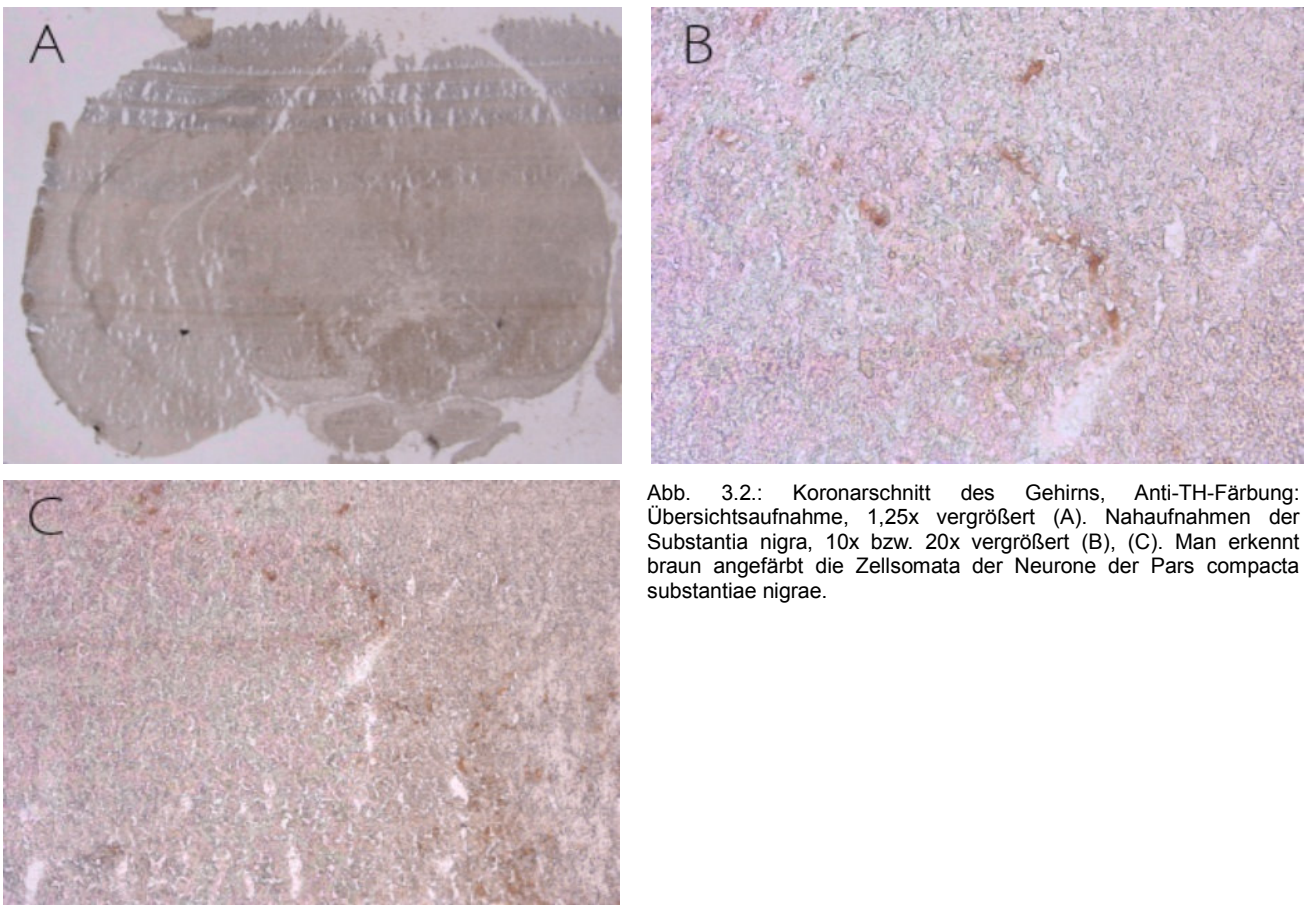


Abb. 3.2.: Koronarschnitt des Gehirns, Anti-TH-Färbung: Übersichtsaufnahme, 1,25x vergrößert (A). Nahaufnahmen der Substantia nigra, 10x bzw. 20x vergrößert (B), (C). Man erkennt braun angefärbt die Zellsomata der Neurone der Pars compacta substantiae nigrae.

3.2.3. Lasermikrodissektion

Mit der Lasermikrodissektion können einzelne Zellen und kleinere Gewebeabschnitte aus einem histologischen Präparat herausgelöst werden. Nach Identifikation des Zielareals wird dieses markiert und mithilfe eines UV-Lasers die Membran durchgeschnitten. Der abgetrennte Bereich der Membran fällt nun mitsamt dem darauf befindlichen Gewebe in ein Gefäß mit Pufferlösung [97]. In den angefertigten Schnitten wurden zunächst die anatomischen Strukturen mikroskopisch identifiziert. Die Strata pyramidale, radiatum und lacunosum moleculare des Hippocampus konnten mithilfe der Nissl-Färbung lokalisiert werden, die Einzelzellen der Substantia nigra mithilfe der Anti-TH-Färbung. Die relevanten Areale – im Hippocampus die einzelnen Schichten in ihrer kompletten

Breite und Länge bei einem Sichtfeld von 20-facher Vergrößerung, in der Substantia nigra 20 Zellsomata – wurden markiert und mit Laser ausgeschnitten (s. Abb. 3.3.). Die Proben fielen in ein mit ATL-Buffer gefülltes Gefäß, jede genannte anatomische Region wurde getrennt und für jedes Tier einzeln gesammelt. Anschließend wurden die Gefäße bis zur DNA-Extraktion bei -80°C gelagert.

Tab. 3.6.: Materialien für Lasermikrodissektion

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|----------------|---------------|------------|
| Leica LMD 7000 | - | Leica |
| Buffer ATL | 19076 | Qiagen |

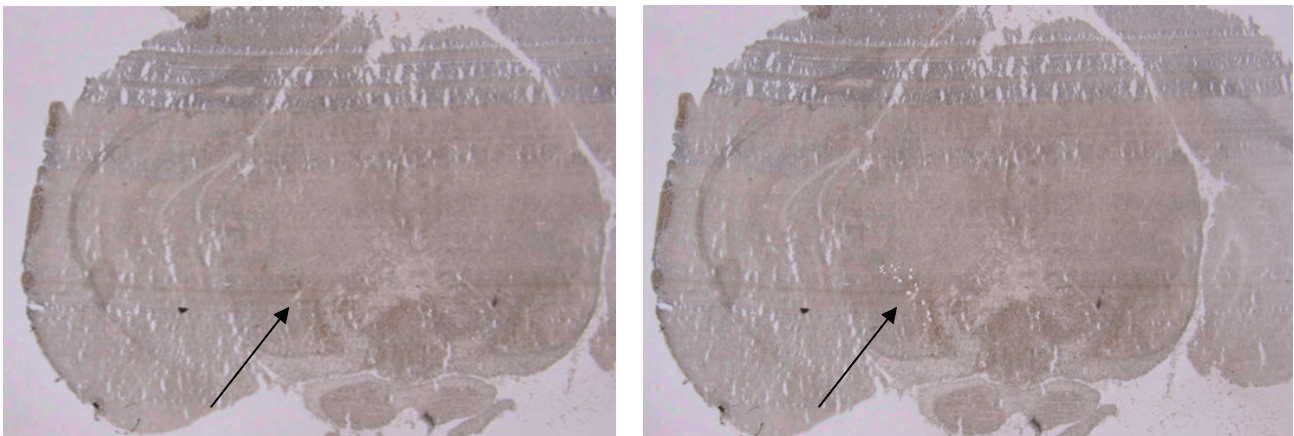


Abb. 3.3.: Koronarschnitt des Gehirns, Anti-TH-Färbung. Links vor der Lasermikrodissektion, rechts danach (1,25x vergrößert). Die Pfeile markieren die Substantia nigra.

3.2.4. DNA-Extraktion

3.2.4.1. DNA-Extraktion aus Homogenat

Zunächst wurde bei -20°C mit einem Skalpell eine dünne Scheibe vom vordersten Teil des Gehirns, dem Bulbus olfactorius, abgeschnitten. Aus diesem wurde dann die DNA gemäß des entsprechenden Protokolls des QIAamp DNA Mini Kits des Herstellers Qiagen gewonnen. Dabei wird in mehreren Arbeitsschritten zunächst die Zelle lysiert und anschließend die DNA an spezielle Silica-Membranen gebunden, während durch mehrmaliges Waschen Proteine, Kationen und andere verunreinigende Substanzen entfernt werden. Abschließend wird die gereinigte DNA mit Wasser von der Membran gelöst und die DNA-Konzentration bestimmt. Dies erfolgt mit dem NanoDrop-Spektrometer, das basierend auf der Absorption der Probe bei 260 nm die Konzentration misst.

Tab. 3.7.: Materialien für DNA-Extraktion aus Homogenat

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|---------------------------------|---------------|------------|
| QIAamp DNA Mini Kit | 51304 | Qiagen |
| NanoDrop 1000, Software: V3.8.1 | 91-ND-1000 | Peqlab |

Protokoll für die DNA-Extraktion aus Homogenat:

1. Zugabe von 180 µl ATL Buffer und 20 µl Proteinase K, dann vortexen und Inkubation im Thermomixer bei 56°C bis zur kompletten Lyse des Gewebes
2. Kurze Zentrifugation
3. Zugabe von 200 µl AL Buffer, 15 Sekunden vortexen, Inkubation bei 70°C für 10 Minuten, kurze Zentrifugation
4. Zugabe von 200 µl 100%igem Ethanol, 15 Sekunden vortexen, kurze Zentrifugation
5. Umfüllen des Lysats in QIAamp Mini Spin Columns und Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute, dann Flüssigkeit verwerfen
6. Zugabe von 500 µl AW1 Buffer, Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute, Flüssigkeit verwerfen
7. Zugabe von 500 µl AW2 Buffer, Zentrifugation bei 14000 rpm für 3 Minuten
8. Einsetzen der QIAamp Mini Spin Columns in frische 2 ml-Gefäße und Zentrifugation bei 14000 rpm für 1 Minute
9. Einsetzen der QIAamp Mini Spin Columns in 1,5 ml-Gefäße, Zugabe von 100 µl destilliertem Wasser, einminütige Inkubation bei Raumtemperatur, Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute
10. Messung der DNA-Konzentration mit NanoDrop: Reinigung des Geräts, Eichung mit 1 µl Wasser, Messung der DNA-Konzentration

3.2.4.2. DNA-Extraktion aus Hippocampus und Substantia nigra

Die DNA-Extraktion erfolgte bei den durch Lasermikrodissektion erhaltenen Geweben des Hippocampus und der Substantia nigra nach dem gleichen Prinzip wie die oben beschriebene Extraktion der DNA des Homogenats, jedoch wurde das QIAamp DNA Micro Kit des Herstellers Qiagen verwendet. Da hier jedoch – im Gegensatz zum Homogenat – von jedem Tier eine gleich große Probenmenge entnommen wurde, wurde nach erfolgter Extraktion keine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

Tab. 3.8.: Materialien für DNA-Extraktion aus Hippocampus und Substantia nigra

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|----------------------|---------------|------------|
| QIAamp DNA Micro Kit | 56304 | Qiagen |

Protokoll für die DNA-Extraktion aus Hippocampus und Substantia nigra:

1. Auftauen der Proben und einminütige Zentrifugation
2. Zugabe von 10 µl Proteinase K, 15 Sekunden vortexen, Inkubation im Thermomixer bei 56°C für 3 Stunden
3. Zugabe von 25 µl ATL Buffer
4. Zugabe von 50 µl AL Buffer und carrier-RNA, 15 Sekunden vortexen

5. Zugabe von 50 µl 100%igem Ethanol, 15 Sekunden vortexen, Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten, kurze Zentrifugation
6. Umfüllen des Lysats in QIAamp MinElute Columns und Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute, dann Flüssigkeit verwerfen
7. Zugabe von 500 µl AW1 Buffer, Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute, Flüssigkeit verwerfen
8. Zugabe von 500 µl AW2 Buffer, Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute, Flüssigkeit verwerfen
9. Einsetzen der QIAamp MinElute Columns in frische 2 ml-Gefäße, Zentrifugation bei 14000 rpm für 3 Minuten
10. Einsetzen der QIAamp MinElute Columns in 1,5 ml-Gefäße, Zugabe von 25 µl destilliertem Wasser, einminütige Inkubation bei Raumtemperatur, Zentrifugation bei 14000 rpm für 1 Minute

3.3. Bestimmung von mtDNA-Kopienzahl und Deletionsgrad

3.3.1. Das Prinzip der PCR

Die PCR ist eine aus repetitiven Arbeitsschritten bestehende Methode zur Vervielfältigung von DNA [98]. Bei der Denaturierung wird die DNA erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrücken, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen werden. Anschließend lagern sich Primer an die DNA-Einzelstränge an und es beginnt die Synthese des komplementären DNA-Stranges durch hitzestabile Taq-Polymerasen. Diese Arbeitsschritte werden wiederholt in Zyklen durchlaufen. Dadurch, dass außer der ursprünglich vorhandenen DNA auch die in den vorangegangenen Zyklen amplifizierte DNA als Vorlage für weitere Kopien dient, steigt der DNA-Gehalt exponentiell an und man erhält relativ schnell große Mengen von DNA [98].

3.3.2. Die quantitative realtime-PCR

Die quantitative realtime-PCR ermöglicht zusätzlich zur DNA-Amplifikation Aussagen über die DNA-Menge. Dabei misst man während der PCR Fluoreszenzsignale, die von der amplifizierten DNA emittiert werden und direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge sind [99].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Signalgenerierung, eine davon ist die Zugabe von sogenannten FRET-Sonden [99]. Diese bedienen sich des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET), bei dem Energie von einem Donor- auf ein Akzeptormolekül (Reporter) übertragen wird. Eine Methode, die bei FRET-Sonden zum Einsatz kommt, ist die Anwendung von sogenannten TaqMan-Probes [99]. Dabei werden Oligonukleotide, die mit einem Fluoreszenzsignal-emittierenden Reporter und einem Fluoreszenzsignal-unterdrückenden Molekül (Quencher) versehen sind, eingesetzt. Initial wird das Signal durch den Quencher unterdrückt, nach Anlagerung der Probes an den zu amplifizierenden DNA-Strang wird der Quencher während der DNA-Synthese durch die Endonuklease-Aktivität der Polymerase abgespalten, wodurch sich

die Distanz zum Reporter vergrößert und der Quencher das Signal nicht mehr absorbieren kann. Der Reporter kann nun ein Fluoreszenzsignal emittieren, das durch entsprechende Messtechniken detektiert werden kann [99]. Abb. 3.4. veranschaulicht schematisch das Prinzip dieser Methode der Signalgenerierung.

PCR and Detection of cDNA

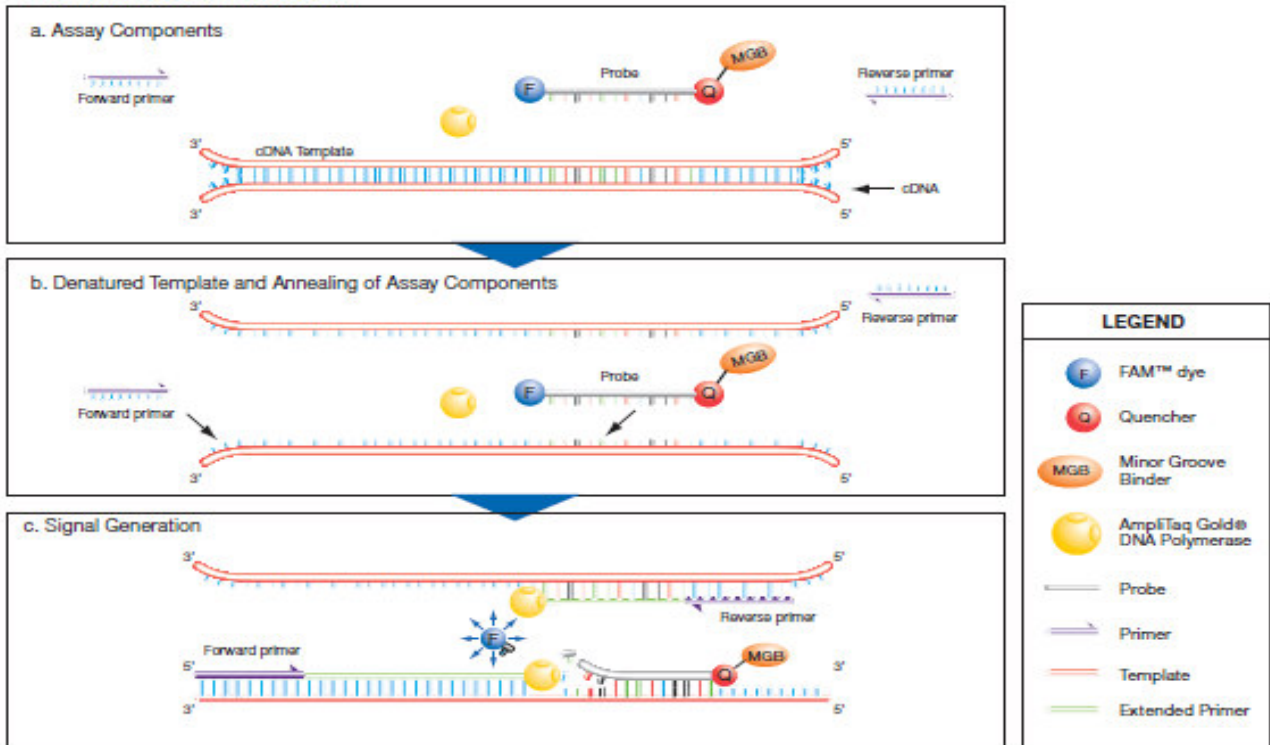


Abb. 3.4.: Schematische Darstellung einer PCR: Reporter (F), Quencher (Q) und Primer lagern sich an den Einzelstrang an (b.). Die Polymerase synthetisiert den Komplementärstrang und trennt Quencher und Reporter, wodurch dieser sein Fluoreszenzsignal emittieren kann (c.) (Abb. aus Manual des Herstellers).

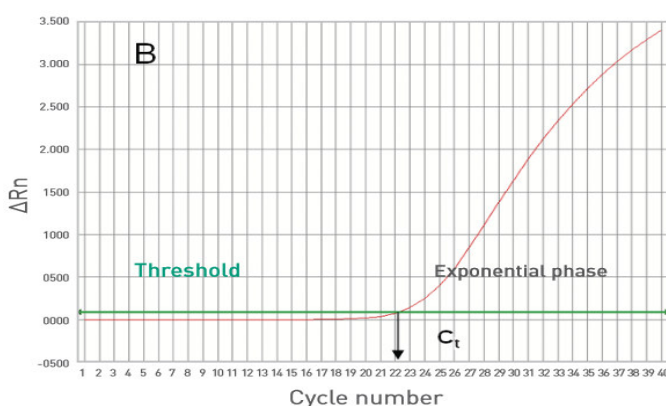


Abb. 3.5.: Schematische Darstellung des Verlaufs des Fluoreszenzsignals (rote Linie). Über mehr als 20 Zyklen hinweg gibt es keinen Anstieg des Signals, dann erfolgt der Übergang in die exponentielle Phase. Der Zykluswert, an dem die rote Linie die grüne Baseline kreuzt, stellt den C_t -Wert dar (Abb. aus Manual des Herstellers).

3.3.3. Der C_t -Wert

Dieses gemessene Fluoreszenzsignal wird nun in einem Diagramm auf der Ordinate gegen die PCR-Zyklen auf der Abszisse eingetragen. Dabei ergibt sich typischerweise eine Kurve wie in Abb. 3.5. dargestellt. Initial erhält man ein unspezifisches, schwaches Signal, das nicht vom Hintergrundrauschen unterschieden werden kann [100]. Nach einigen Zyklen beginnt ein exponentielles Wachstum, bis die Kurve sich letztendlich ihrem Maximum nähert und abflacht [100].

Man legt nun einen Grenzwert auf der Ordinate fest, dessen Überschreiten kein Hintergrundrauschen mehr, sondern ein echtes Wachstumssignal darstellt. Der Zykluswert auf der Abszisse, an dem das Fluoreszenzsignal diesen Grenzwert überschreitet, wird als Beginn der exponentiellen Wachstumsphase angesehen und als C_T -Wert bezeichnet [100]. Je mehr DNA anfangs vorhanden war, umso früher überschreitet das Signal den Grenzwert und man erhält entsprechend einen niedrigeren C_T -Wert, analog führen geringere DNA-Mengen zu einem höheren C_T -Wert [100]. Da also der C_T -Wert ein Maß für die DNA-Menge ist, kann man mit Rechenmodellen wie im nächsten Abschnitt dargestellt Rückschlüsse auf die Anzahl mitochondrialer Gene und den Deletionsgrad ziehen.

Tab. 3.9.: Materialien für die quantitative realtime PCR

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|--|----------------|--------------------|
| step one plus real-time PCR System, Software: StepOne™ v2.0 | 4376592 | Applied Biosystems |
| ND1-Any | Lot 911611 | |
| CytB-Any | Lot 913082 C3 | |
| Cox3-Any | Lot 911611 C12 | |
| ACTB | 4352933 | Applied Biosystems |
| TaqMan® Gene Expression Master Mix | 4369016 | Applied Biosystems |
| MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate | 4346906 | Applied Biosystems |
| MicroAmp 96-Well Optical Adhesive Film | 4311971 | Applied Biosystems |

Protokoll für die quantitative realtime-PCR:

1. Erstellen der Blutverdünnungen im Verhältnis 1:10 und 1:100
2. Erstellen des Master Mixes mit einem Volumen von 18 µl:

| | |
|------------------|-------|
| Master Mix | 10 µl |
| Primer Probe | 1 µl |
| H ₂ O | 7 µl |
3. Verdünnung der Proben mit H₂O auf eine Konzentration von 1 ng/µl
4. Befüllen der Wells der Reaction Plate mit dem Master Mix
5. Befüllen der Wells der Reaction Plate mit 2 µl der Proben, der Wildtypblut-DNA bzw. der Leerkontrollen mit Wasser, z.B. nach dem Belegungsplan in Abb. 3.6.

| ACTB | | | CYTB | | | COX3 | | | ND1 | | |
|---------------------|---------------------|----------|---------------------|---------------------|----------|---------------------|---------------------|----------|---------------------|---------------------|----------|
| Wildtyp-Blut | Wildtyp-Blut | Probe 9 | Wildtyp-Blut | Wildtyp-Blut | Probe 9 | Wildtyp-Blut | Wildtyp-Blut | Probe 9 | Wildtyp-Blut | Wildtyp-Blut | Probe 9 |
| Wildtyp-Blut, 1:10 | Wildtyp-Blut, 1:10 | Probe 10 | Wildtyp-Blut, 1:10 | Wildtyp-Blut, 1:10 | Probe 10 | Wildtyp-Blut, 1:10 | Wildtyp-Blut, 1:10 | Probe 10 | Wildtyp-Blut, 1:10 | Wildtyp-Blut, 1:10 | Probe 10 |
| Wildtyp-Blut, 1:100 | Wildtyp-Blut, 1:100 | Probe 11 | Wildtyp-Blut, 1:100 | Wildtyp-Blut, 1:100 | Probe 11 | Wildtyp-Blut, 1:100 | Wildtyp-Blut, 1:100 | Probe 11 | Wildtyp-Blut, 1:100 | Wildtyp-Blut, 1:100 | Probe 11 |
| H ₂ O | H ₂ O | Probe 12 | H ₂ O | H ₂ O | Probe 12 | H ₂ O | H ₂ O | Probe 12 | H ₂ O | H ₂ O | Probe 12 |
| Probe 1 | Probe 5 | Probe 13 | Probe 1 | Probe 5 | Probe 13 | Probe 1 | Probe 5 | Probe 13 | Probe 1 | Probe 5 | Probe 13 |
| Probe 2 | Probe 6 | Probe 14 | Probe 2 | Probe 6 | Probe 14 | Probe 2 | Probe 6 | Probe 14 | Probe 2 | Probe 6 | Probe 14 |
| Probe 3 | Probe 7 | Probe 15 | Probe 3 | Probe 7 | Probe 15 | Probe 3 | Probe 7 | Probe 15 | Probe 3 | Probe 7 | Probe 15 |
| Probe 4 | Probe 8 | Probe 16 | Probe 4 | Probe 8 | Probe 16 | Probe 4 | Probe 8 | Probe 16 | Probe 4 | Probe 8 | Probe 16 |

Abb. 3.6.: Beispielhafter Belegungsplan einer PCR-Platte. Die Wells sind farblich unterschiedlich dargestellt je nach amplifiziertem Gen. Pro Gen werden 6 Wells durch Wildtyp-Blut in drei doppelbestimmten Verdünnungsstufen und 2 Wells durch Leerproben belegt. Folglich können bis zu 16 Proben pro Experiment untersucht werden.

6. Verschluss der Platte und Zentrifugation

7. Einlegen der Platte in das PCR-Gerät, Starten der Software stepone software v2.0 und Beginn der PCR:

- a. 2 Minuten bei 50°C
- b. 10 Minuten bei 95°C
- c. 15 Sekunden bei 95°C, dann 1 Minute bei 60°C (40-mal wiederholt)

3.3.4. Rechenmodelle auf Grundlage des C_t-Wertes

3.3.4.1. Die relative Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl aus Homogenat

Zur Berechnung der mtDNA-Kopienzahl aus Homogenat amplifiziert man mitochondrial kodierte Gene, in diesem Fall ND1 (Gen-Identifizier-Code: 17716), CytB (17711) und COX3 (17710), und ein nukleär kodiertes Gen wie ACTB (11461) und bestimmt jeweils die C_t-Werte. Über den Vergleich der Werte nukleär und mitochondrial kodierter Gene sowohl im Homogenat als auch in Wildtyp-Kontrollblut kann man Rückschlüsse auf die relative Kopienzahl der mtDNA ziehen. Man bestimmt die Differenz der C_t-Werte zwischen den mitochondrialen Genen und ACTB, die ΔC_t -Werte. Da drei mitochondriale Gene amplifiziert werden, erhält man drei ΔC_t -Werte, von denen für die folgenden Rechenschritte der größte ausgewählt wird [101]. Nun erhält man den $\Delta\Delta C_t$ -Wert durch Bildung

der Differenz aus den ΔC_t -Werten von Probe und Kontrollblut-DNA. Die relative mtDNA-Kopienzahl wird daraus mit folgender Formel berechnet:

$$\text{mtDNA-Kopienzahl} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Um die Rechnung zu präzisieren, amplifiziert man das Kontrollblut in mehreren Verdünnungsstufen. Dadurch erhält man mehrere C_t -Wert-Paare, die man in einem Koordinatensystem als Eichgerade gegeneinander auftragen kann, und kann jedem beliebigen ACTB- C_t -Wert seinen „idealen“ Partner- C_t -Wert der anderen Gene zuordnen, den das Wildtypblut an dieser Stelle eingenommen hätte. Somit ergibt sich für jeden reell gemessenen ACTB- C_t -Wert der Proben der im Wildtypblut zu erwartende C_t -Wert der anderen Gene und man kann die Differenz aus diesem und dem in der Probe gemessenen C_t -Wert bestimmen.

3.3.4.2. Die absolute Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl aus Hippocampus und Substantia nigra

Die Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl aus Einzelzellen erfolgt über den Vergleich mit Standards. Die Standards werden in drei Verdünnungsstufen mit bekannter Gen-Menge amplifiziert und der jeweilige dekadische Logarithmus in einem Koordinatensystem gegen die im Experiment gemessenen C_t -Werte der Standards aufgetragen. Es besteht ein linearer Zusammenhang, entsprechend erhält man eine Gerade und kann eine Gleichung der Form $y = m \cdot x + t$ aufstellen, die Steigung m und der Achsenabschnitt t können mithilfe der Standards bestimmt werden. Wenn man nun als x in diese Formel die C_t -Werte der untersuchten Proben einsetzt, kann man y errechnen und erhält damit den Exponenten für die Formel

$$\text{mtDNA-Kopienzahl} = 10^y,$$

mit der man die absolute mtDNA-Kopienzahl erhält. Diese Rechnung führt man mit allen amplifizierten Genen aus, der Maximalwert wird als mtDNA-Kopienzahl angesehen.

3.3.4.3. Die Bestimmung des Deletionsgrades

Grundlage dieses Rechenmodells ist die für menschliche DNA entwickelte ND1/ND4-Methode [102]. Diese basiert auf der Erkenntnis, dass Deletionen der mtDNA fast immer im Bereich des ND4-Gens liegen und selten im Bereich des ND1-Gens [103]. Ein Bereich des ND1-Gens ist bei über 95 % der Fälle mit mtDNA-Deletionen konserviert, während bei 82-96 % der Fälle mit mtDNA-Deletionen eine Region des ND4-Gens deletiert ist [103]. Daraus wurde eine Methode zur Deletionsbestimmung durch Quantifizierung von ND1 und ND4 entwickelt [102]. In einer Modifizierung dieser Technik für murine mtDNA werden in unserer Arbeitsgruppe insgesamt drei jeweils etwa gleich weit voneinander entfernte Gene – CYTB und COX3, die bei den Positionen 2752 bzw. 8609 beginnen und auf dem großen Bogen liegen, und ND1 auf dem kleinen Bogen,

Beginn bei Position 14148 – amplifiziert [101]. Aus den 6 möglichen Kombinationen der Gene werden die ΔC_T -Werte berechnet und der Maximalwert ausgewählt. Anschließend werden wie im Kap. 3.2.4.1. beschrieben die $\Delta\Delta C_T$ -Werte von Proben und Wildtyp-DNA verglichen und in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Deletionen}_{\text{mtDNA}} = (1 - 2^{-\Delta\Delta C_T}) * 100.$$

3.4. Die Messung der Mitochondrienzahl

3.4.1. Proteinisolation aus Homogenat

Zur Gewinnung von Proteinen werden mit einem speziellen Zellyse-Reagenz die Zellen lysiert und die Proteine in Flüssigkeit gelöst. Zugabe von Protease- und Phosphataseinhibitoren verhindert dabei die Degradation der Proteine.

Tab. 3.10.: Materialien für Proteinisolation aus Homogenat

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|---|----------------------|-------------------|
| CellLytic™ MT Cell Lysis Reagent | C3228-50ML | Sigma Aldrich |
| PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets | 04906837001 | Roche |
| cOMplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYPACK | 4693116001 | Roche |

Protokoll für die Proteinisolation:

1. Abschneiden einer Scheibe des Riechkolbens des Gehirns bei -20°C mit einem Skalpell
2. Mischen des Gewebes mit Zellysereagenz (20 µl), Proteaseinhibitor (0,5 µl) und Phosphataseinhibitor (2 µl)
3. Durchmischen mit einer Pipette, bis die Flüssigkeit klar wird
4. Zentrifugieren der Proben bei 4°C für 10 Minuten
5. Umfüllen des Überstands mit den Proteinen in ein neues Gefäß, Pellet verwerfen.

3.4.2. Protein-Konzentrationsmessung mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde der BCA-Assay verwendet. Dabei wird Kupfer in zwei Schritten reduziert, was zu einem Farbumschlag führt. Im ersten Schritt findet die sogenannte Biuret-Reaktion statt, bei der zweiwertige Kupferionen durch Peptidbindungen zu einwertigen reduziert werden, wobei ein farbiger Komplex entsteht. Die Farbreaktion kann nun durch eine weitere Reaktion noch verstärkt werden. Bicinchoninsäure (BCA) komplexiert mit einwertigen Kupferionen und führt zu einem noch intensiveren Farbumschlag mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Diese Absorption ist proportional zur Proteinmenge und

korreliert mit ihr zuverlässig über mehrere Größenordnungen [104]. Durch Messung der Absorption der unbekanntenen Proben und Vergleich mit Absorptionswerten bekannter Proteinmengen anhand einer Standard-Reihe kann die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Tab. 3.11.: Materialien für Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|--|---------------|-------------------|
| Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/ml | 23209 | Thermo Scientific |
| BCA Protein Assay Reagent A | 23228 | Thermo Scientific |
| BCA Protein Assay Reagent B | 23224 | Thermo Scientific |
| Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden | 655101 | Greiner Bio One |
| VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader, Software: WorkOut 2.5 | 2030-0030 | PerkinElmer |

Protokoll:

1. Herstellung von Standards aus bovinem Serumalbumin (BSA) mit bekannter Konzentration
 - a. 2000 µg/ml (300 µl unverdünntes BSA)
 - b. 1500 µg/ml (375 µl BSA + 125 µl PBS)
 - c. 1000 µg/ml (325 µl BSA + 325 µl PBS)
 - d. 750 µg/ml (175 µl Lösung b + 175 µl PBS)
 - e. 500 µg/ml (325 µl Lösung c + 325 µl PBS)
 - f. 250 µg/ml (325 µl Lösung e + 325 µl PBS)
 - g. 125 µg/ml (325 µl Lösung f + 325 µl PBS)
 - h. 25 µg/ml (100 µl Lösung g + 400 µl PBS)
2. Mischen von Reagent A und Reagent B im Verhältnis 49:1
3. Pipettieren von 10 µl Standards (Doppelbestimmung) bzw. von 2 µl der Proben und 8 µl Wasser in die Wells (Einfachbestimmung) nach Belegungsplan, s. Abb. 3.7.
4. Zugabe von 90 µl Reagent-Mix zu den gefüllten Wells
5. Inkubation für 15 Minuten bei 60°C
6. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration unter Berücksichtigung der 5-fachen Verdünnung mittels Plate Reader

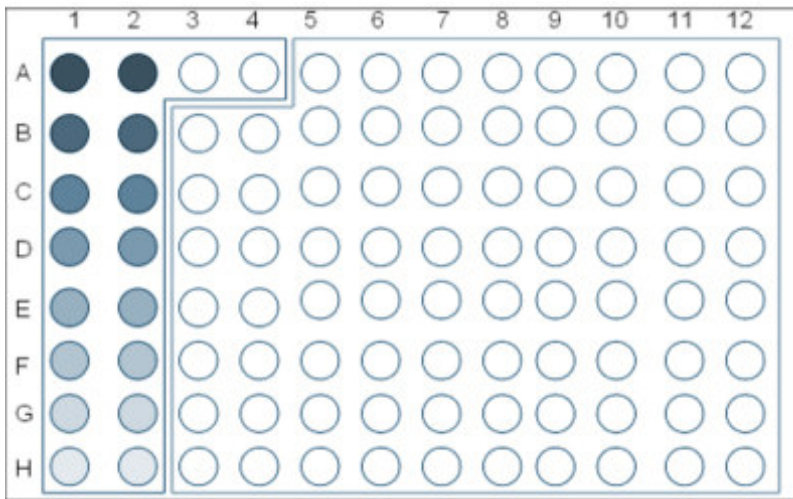


Abb. 3.7. (modifiziert nach [105]): Beispiel für die Belegung einer Platte: Dunkel umrahmt die Wells für die Standards, die mit absteigender Konzentration eine abnehmende Signalintensität zeigen. Hell umrahmt die Wells, die für Proben benutzt werden können.

3.4.3. Western Blot

Der Western Blot ist eine Nachweismethode zur semiquantitativen Bestimmung von Proteinen [106]. Zunächst wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die Proteine in einem Gel durch Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das Gel aus Polyacrylamid behindert dabei die Wanderung der Proteine abhängig von deren Größe, weshalb kleine Proteine eine größere Strecke durchlaufen [107]. Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat werden alle Proteine denaturiert und Unterschiede in den Ladungen, die die Wanderungseigenschaften beeinflussen könnten, aufgehoben [107, 108]. Um die Proben für die folgenden Untersuchungsschritte nutzbar zu machen, erfolgt nun das eigentliche „Blotting“. Darunter versteht man die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Membran aus PVDF unter erneutem Anlegen elektrischer Spannung (s. Abb. 3.8.) [108].

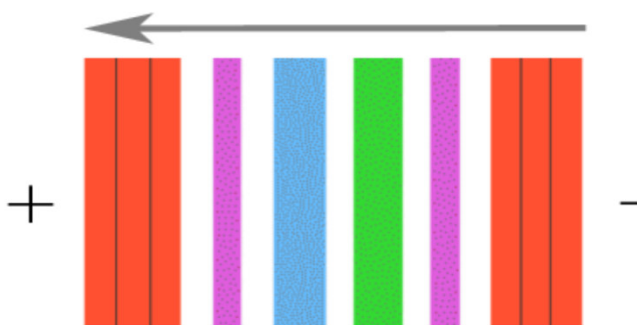


Abb. 3.8.: Schematische Darstellung des Blottings: eingerahmt von je drei Schwämmen (rot) und einem Filterpapier (lila) findet der Transfer der Proteine von dem Gel (grün) auf die Membran (blau) statt. Der Proteinfluss erfolgt nach Anlegung einer Spannung vom Minus- zum Plus-Pol.

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen in der nachfolgenden Immunodetektion und Verbesserung der Qualität wird die Membran anschließend mit Tween-20 geblockt [109]. Bei der Immunodetektion wird zunächst ein primärer, direkt an das zu detektierende Protein bindender Antikörper zugegeben, an den wiederum ein sekundärer Antikörper bindet [109]. Dieser enthält ein Markerenzym wie Meerrettich-Peroxidase [109], das nach Versetzung mit einem Chemilumineszenzsubstrat ein Signal aussendet, welches digital erfasst werden kann [110].

Sollen mehrere Proteine nachgewiesen werden, so kann man die Membran mehrere Male wiederverwenden. Beim sogenannten Stripping werden die gebundenen Antikörper unter Schonung der auf der Membran befindlichen Proteine entfernt [111]. Nach erneutem Waschen und Blocken kann die Membran für weitere Experimente benutzt werden.

In dieser Arbeit wurden zwei Proteine detektiert: Actin- β ist ein „housekeeping protein“ und dient als Qualitätskontrolle zur Bestätigung, dass bei allen Proben die gleiche Proteinmenge verwendet wurde [106]. Bei VDAC handelt es sich um ein Protein der Mitochondrienmembran. Es liegt in drei Isoformen vor und dient als spannungsabhängiger Anionenkanal der äußeren Mitochondrienmembran [112]. Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens [112] kann es als Indikator für die Mitochondrienmasse verwendet werden [101].

Tab. 3.12.: Materialien für Western Blot

| Material | Produktnummer | Hersteller |
|--|---------------|-------------------|
| NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) | NP0007 | Invitrogen |
| NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) | NP0009 | Invitrogen |
| NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm | | Invitrogen |
| 10 well | NP0321BOX | |
| 12 well | NP0322BOX | |
| 15 well | NP0323BOX | |
| NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x) | NP0002 | Invitrogen |
| SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (1x) | LC5925 | Invitrogen |
| Methanol zur Analyse EMSURE® | 106009 | Merck Chemicals |
| SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (1x) | LC5925 | Invitrogen |
| NuPAGE® Transfer Buffer (20x) | NP0006 | Invitrogen |
| Primäre Antikörper | | |
| Rb pAb to VDAC1/Porin | ab15895 | abcam |
| Rb pAb to beta Actin | ab8227 | abcam |
| ImmunoPure Antibody Goat anti-Rabbit IgG | 31460 | Thermo Scientific |
| Pierce ECL Western Blotting Substrate | 32106 | Thermo Scientific |
| Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer | 46430 | Thermo Scientific |
| Fusion FX7, Software: Fusion-Capt™ | | Vilber Lourmat |

Protokoll für den Western Blot:

1. Elektrophorese

- a. Mischen der 25 μ l-Proben: 3 μ l Reducing Agent + 7,5 μ l Sample Buffer + Zelllysat mit 15 μ g Proteinmenge + Auffüllen auf 25 μ l mit Wasser
- b. Inkubation der Proben bei 70°C für 10 Minuten mit anschließender Zentrifugation
- c. 40 ml Running Buffer mit 760 ml Wasser mischen

- d. Gel in Elektrophoresekammer einspannen und die Kammer mit dem Running Buffer füllen
- e. Spülen der Wells mit Running Buffer
- f. Einpipettieren von Standard und Proben
- g. Elektrophorese bei 200 V für 50 Minuten, Kühlung mit Eis

2. Blotting

- a. Herstellen des Transfer Buffers: 50 ml NuPAGE® Transfer Buffer + 100 ml Methanol + 850 ml Wasser
- b. Filterpapiere in Transfer Buffer einlegen
- c. Waschen der Membran in Methanol und einlegen zwischen die Filterpapiere im Transfer Buffer
- d. Schwämme in Transfer Buffer befeuchten
- e. Gel aus Elektrophoresekammer entfernen und auf Membran übertragen
- f. Anordnung der Bestandteile in folgender Reihenfolge: 3 in Transfer Buffer getränkte Schwämme – Filter – Gel – Membran – Filter – 3 in Transfer Buffer getränkte Schwämme
- g. Entfernung von Luftblasen, Einsetzen der einzelnen Elemente gemäß oben genannter Anordnung in die Blotkammer, innen mit Transfer Buffer auffüllen, außen mit Leitungswasser
- h. Anlegen einer Spannung von 35 V über eine Stunde, Kühlung mit Eis

3. Immunodetektion

- a. Membran 3x in PBS waschen
- b. Blocken durch einstündiges Schwenken in Blocking Buffer
- c. Inkubation in primärem Antikörper, Actin- β für eine Stunde bei Raumtemperatur, VDAC im Kühlschrank über Nacht
- d. 3x mit PBS-T waschen, beim vierten Waschvorgang 15 Minuten in PBS schwenken
- e. Inkubation mit sekundärem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur
- f. Waschen in PBS-T für eine Stunde und PBS für 30 Minuten
- g. Eine Minute lichtgeschützt mit je 2 ml der Bestandteile des Pierce ECL Western Blotting Substrate inkubieren
- h. Membran luftblasenfrei in Klarsichthülle einlegen, abtrocknen, Detektion des Chemolumineszenzsignals in Fusion FX7-Gerät

4. Ggf. Stripping

- a. Membran in PBS waschen
- b. Inkubation mit Stripping Buffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur
- c. 2x mit PBS waschen
- d. Beginn einer erneuten Immunodetektion mit Schritt 3. b.

3.5. Statistik

3.5.1. Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl in Abhängigkeit vom Parkin-Expressionsprofil

Es wurde jeweils eine Gruppe von Wildtyp-Tieren mit einem der drei anderen Genotypen verglichen. Für jeden Mutations-Genotyp gab es eine eigene Gruppe von Wildtypen.

Auf Homogenats-Ebene wurden in der Gruppe der 2 Monate alten Tiere 3 Knockout-Mäusen 3 Wildtypen gegenübergestellt. In der Gruppe der 9 Monate alten Tiere wurden 7 Knockout-Mäusen 5 Wildtypen, 5 Mäusen mit human-pathogener Stop-Mutation 6 Wildtypen und 4 Mäusen mit zusätzlicher Expression von humanem Parkin 4 Wildtypen gegenübergestellt. In der Gruppe der 12 Monate alten Tiere wurden 6 Knockout-Mäusen 6 Wildtypen, 4 Mäusen mit human-pathogener Stop-Mutation 5 Wildtypen und 6 Mäusen mit zusätzlicher Expression von humanem Parkin 5 Wildtypen gegenübergestellt.

Um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen, wurden für jedes Tier die Deletionsgrade sowie die mtDNA-Kopienzahl mindestens viermal bestimmt.

Auf Hippocampus-Ebene wurden in der Gruppe der 9 Monate alten Tiere 3 Knockout-Mäusen 3 Wildtypen und in der Gruppe der 12 Monate alten Tiere 6 Knockout-Mäusen 6 Wildtypen gegenübergestellt. Für jedes Tier wurden Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl einmal bestimmt.

Auf Substantia nigra-Ebene wurden in der Gruppe der 9 Monate alten Tiere 3 Knockout-Mäusen 3 Wildtypen und in der Gruppe der 12 Monate alten Tiere 6 Knockout-Mäusen 5 Wildtypen gegenübergestellt. Für jedes Tier erfolgte mindestens eine Doppelbestimmung von Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl. Aus den erfolgten Messungen wurde für jedes Tier ein Mittelwert für Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl gebildet.

Anschließend wurde aus den Mittelwerten der einzelnen Tiere ein Mittelwert für jede Gruppe sowie die Standardabweichung errechnet. Diese Werte stellen die für uns bedeutenden Parameter dar und werden im Ergebnisteil detailliert vorgestellt.

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte durch das Programm Microsoft Excel mit der Formel

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen den Gruppen wurde ein zweiseitiger T-Test mit einem angestrebten Signifikanzniveau $p < 0,05$ durchgeführt und nach folgender Formel durch das Programm Microsoft Excel berechnet

$$T = \sqrt{n} \frac{\bar{X} - \mu_0}{S}$$

Die Nullhypothese lautete:

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen bezüglich Deletionsgrad oder mtDNA-Kopienzahl.

Die Alternativhypothese lautete:

Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen bezüglich Deletionsgrad oder mtDNA-Kopienzahl.

Die Alternativhypothese wurde bei $p < 0,05$ als bestätigt angesehen.

3.5.2. Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl mit zunehmendem Alter

Da sich in oben genannten Berechnungen außer beim Vergleich von Wildtyp-Tieren mit Mäusen mit zusätzlicher Expression von humanem Parkin keine Unterschiede zeigten, wurden Tiere gleichen Alters mit unterschiedlichem Genotyp zu einer Gruppe vereint.

Man erhielt so auf Homogenats-Ebene eine Gruppe 2 Monate alter Mäuse mit 6 Tieren (3 Wildtyp, 3 Knockout), zwei Gruppen 9 Monate alter Mäuse mit 12 Tieren (5 Wildtyp, 7 Knockout) bzw. 11 Tieren (6 Wildtyp, 5 mit human-pathogene Stop-Mutation) und zwei Gruppen 12 Monate alter Mäuse mit 12 Tieren (6 Wildtyp, 6 Knockout) bzw. 9 Tieren (5 Wildtyp, 4 mit human-pathogener Stop-Mutation).

Auf Substantia nigra-Ebene erhielt man eine Gruppe 9 Monate alter Mäuse mit 6 Tieren (3 Wildtyp, 3 Knockout) und eine Gruppe 12 Monate alter Mäuse mit 11 Tieren (5 Wildtyp, 6 Knockout).

Auf Hippocampus-Ebene erhielt man eine Gruppe 9 Monate alter Mäuse mit 6 Tieren (3 Wildtyp, 3 Knockout) und eine Gruppe 12 Monate alter Mäuse mit 12 Tieren (6 Wildtyp, 6 Knockout).

Die weiteren Berechnungen wurden analog zu Kap. 3.5.1. durchgeführt.

3.5.3. Deletionsgrad in Abhängigkeit von der anatomischen Region

Analog zu Kap. 3.5.2. wurden auch die Gewebeproben der einzelnen anatomischen Regionen von Tieren unterschiedlichen Genotyps zusammengefasst.

Es wurden die in Kap. 3.5.2. genannten Gruppen der Substantia nigra und des Hippocampus verwendet. Auf Homogenats-Ebene wurden für diese Analysen die 9 Monate alte Gruppe mit 12 Tieren (5 Wildtyp, 7 Knockout) sowie die 12 Monate alte Gruppe mit 12 Tieren (6 Wildtyp, 6 Knockout) herangezogen.

Es wurden jeweils Gruppen gleichen Alters miteinander verglichen und Berechnungen analog zu Kap. 3.5.1. durchgeführt.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden mittels quantitativer realtime-PCR die Deletionsgrade und die mtDNA-Kopienzahl aus Maushirnen bestimmt und ein Western Blot zur Bestimmung der Mitochondrienzahl durchgeführt.

Das Gewebe stammte aus Lasermikrodissekatoren von Substantia nigra und Hippocampus sowie homogenisiertem Gewebe des Bulbus olfactorius. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt.

4.1. Deletionsgrad

4.1.1. Zusammenhang zwischen Deletionsgrad und Parkin-Expressionsprofil

Bei 12 Monate alten Tieren mit zusätzlicher Expression von humanem Wildtyp-Parkin zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Deletionsgrades im Vergleich zu Wildtypen im Homogenat. Er lag in der Wildtypgruppe bei durchschnittlich 11,4 % (Mittelwert) \pm 4,4 % (Standardabweichung), in der Vergleichsgruppe bei 17,2 % \pm 2,2 %, $p=0,02$ (s. Abb. 4.1.). Sonst ergaben sich in keinem Gewebe bei keinem der anderen Expressionsmuster signifikante Unterschiede zu den Wildtypen, die Ergebnisse werden in Abb. 4.1. und Tab. 4.1. gezeigt.

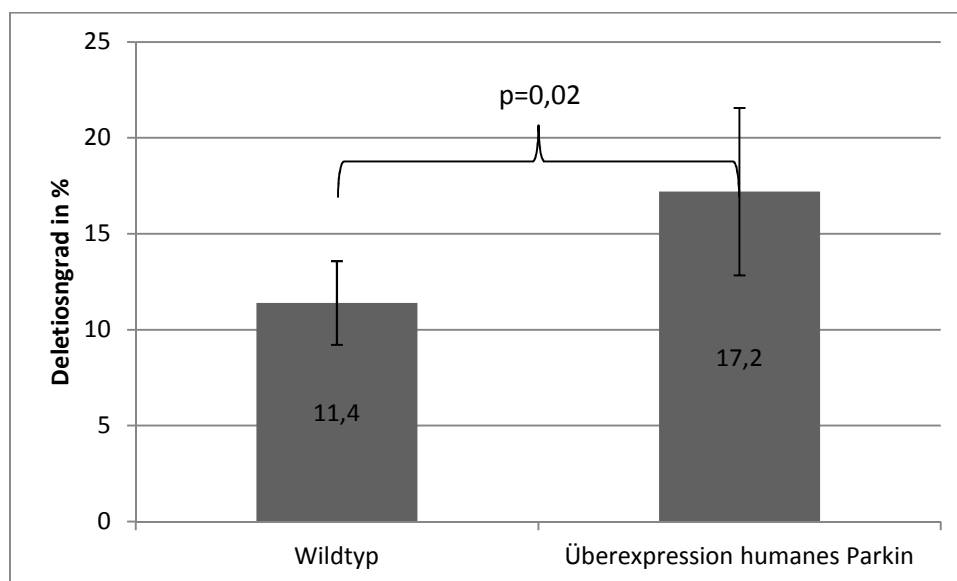


Abb. 4.1.: Erhöhter Deletionsgrad im Homogenat bei Mäusen mit zusätzlicher Expression von humanem Wildtyp-Parkin (6 Mäuse im Alter von 12 Monaten) im Vergleich zu Wildtypen (5 Mäuse im Alter von 12 Monaten).

Tab. 4.1.: Vergleich des Deletionsgrades von Wildtypen mit Mutanten in verschiedenen Geweben und Altersgruppen. Übersicht sämtlicher Ergebnisse mit Standardabweichung und T-Test, signifikante Ergebnisse fett markiert.

| Deletionsgrad | | | | | | |
|----------------------------------|----------|----------|------------------|------------|--------------------|--------|
| Gewebe | Alter | Genotyp | Anzahl der Tiere | Mittelwert | Standardabweichung | T-Test |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 2 Monate | Wildtyp | 3 | 20,6 | 4,9 | |
| | | Knockout | 3 | 24,8 | 1,9 | 0,24 |
| | 9 Monate | Wildtyp | 5 | 30,3 | 4,3 | |
| | | Knockout | 7 | 30,5 | 3,8 | 0,93 |
| | Wildtyp | 6 | 26,4 | 6,4 | | |

| | | | | | | |
|------------------------------|-----------|-----------------------|----------|-------------|------------|-------------|
| | | Stop-Mutation | 5 | 29,4 | 2,0 | 0,34 |
| | | Wildtyp | 4 | 12,2 | 3,8 | |
| | | humanes Parkin | 4 | 11,4 | 0,8 | 0,7 |
| | 12 Monate | Wildtyp | 6 | 22,1 | 2,8 | |
| | | Knockout | 6 | 20,7 | 3,2 | 0,41 |
| | | Wildtyp | 5 | 20,9 | 3,2 | |
| | | Stop-Mutation | 4 | 19,7 | 5,6 | 0,69 |
| | | Wildtyp | 5 | 11,4 | 4,4 | |
| | | humanes Parkin | 6 | 17,2 | 2,2 | 0,02 |
| Neurone der Substantia nigra | 9 Monate | Wildtyp | 3 | 22,8 | 5,1 | |
| | | Knockout | 3 | 25,7 | 11,1 | 0,7 |
| | 12 Monate | Wildtyp | 6 | 17,4 | 3,6 | |
| | | Knockout | 6 | 14,8 | 4,8 | 0,36 |
| Neurone des Hippocampus | 9 Monate | Wildtyp | 3 | 18,3 | 9,1 | |
| | | Knockout | 3 | 14,6 | 7,4 | 0,36 |
| | 12 Monate | Wildtyp | 6 | 20,4 | 14,4 | |
| | | Knockout | 6 | 17,4 | 8,3 | 0,45 |

4.1.2. Zusammenhang zwischen Deletionsgrad und Alter

Es wurde untersucht, ob der Deletionsgrad abhängig vom Alter ist. Da zwischen den Knockout-Mäusen und den Wildtypen sowie Mäusen mit Stop-Mutation und Wildtypen in den einzelnen Altersgruppen kein signifikanter Unterschied bestand, wurden die unter Punkt 4.1.1. miteinander verglichenen Gruppen als einheitliche Gruppe ausgewertet. Dadurch erhielt man Gruppen mit 6 bis 12 Tieren mit unterschiedlicher Parkin-Expression (Wildtyp und je eine Mutation) gleichen Alters und stellte ihr eine analog gebildete Kontrollkohorte unterschiedlichen Alters zum Vergleich gegenüber.

Im Homogenat zeigte sich bei Gruppen aus Knockout- und Wildtyp-Mäusen altersabhängig ein signifikanter Anstieg des Deletionsgrades von 22,7 % ± 4,0 % bei 2 Monaten auf 30,4 % ± 3,8 % bei 9 Monaten, p=0,001. Von 9 auf 12 Monate fiel der Deletionsgrad im Homogenat und in der Substantia nigra ab (30,4 % ± 3,8 % auf 21,4 % ± 2,9 %, 27,8 % ± 4,9 % auf 20,4 % ± 4,2 %, 24,3 % ± 7,9 % auf 16 % ± 4,3 %, jeweils p<0,05). Im Hippocampus zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Die Ergebnisse werden in den Abb. 4.2.-4.4. sowie Tab. 4.2. gezeigt.

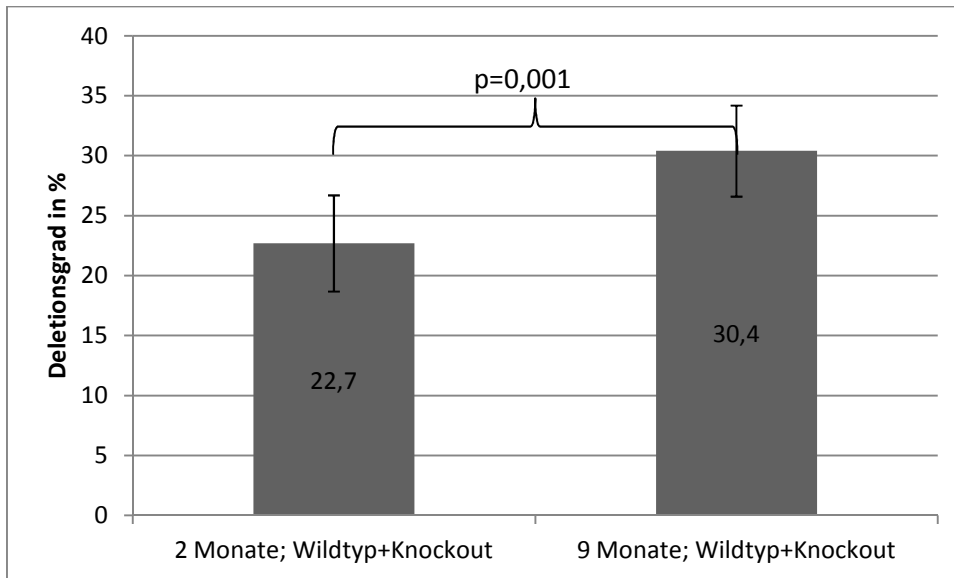


Abb. 4.2.: Anstieg des Deletionsgrades im Homogenat von 2 Monaten (6 Mäuse) auf 9 Monate (12 Mäuse).

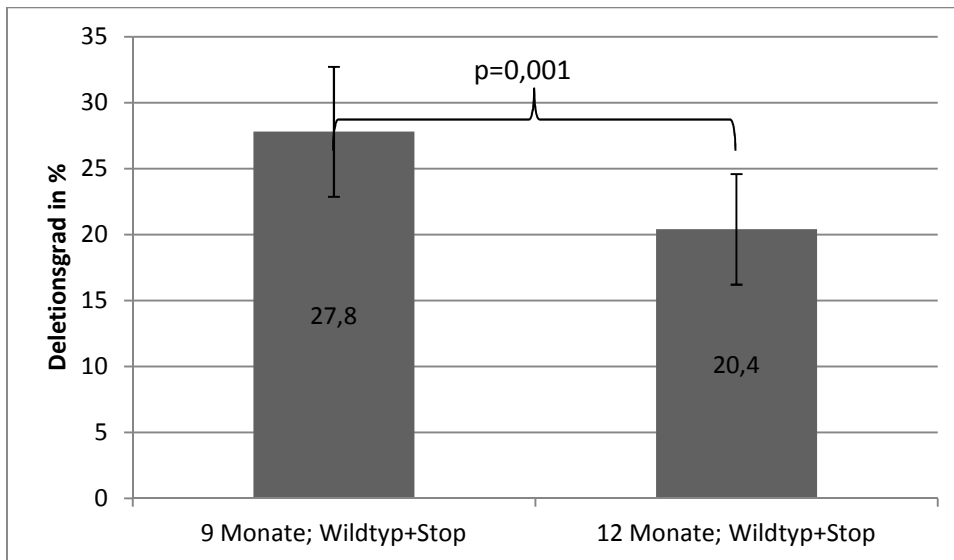


Abb. 4.3.: Repräsentativ für den Abfall des Deletionsgrades von 9 auf 12 Monate in Substantia nigra und Homogenat die graphische Gegenüberstellung des Deletionsgrades im Homogenat von 12 Mäusen im Alter von 9 Monaten (Wildtyp und Stop-Mutation) und 9 Mäusen im Alter von 12 Monaten (Wildtyp und Stop-Mutation).

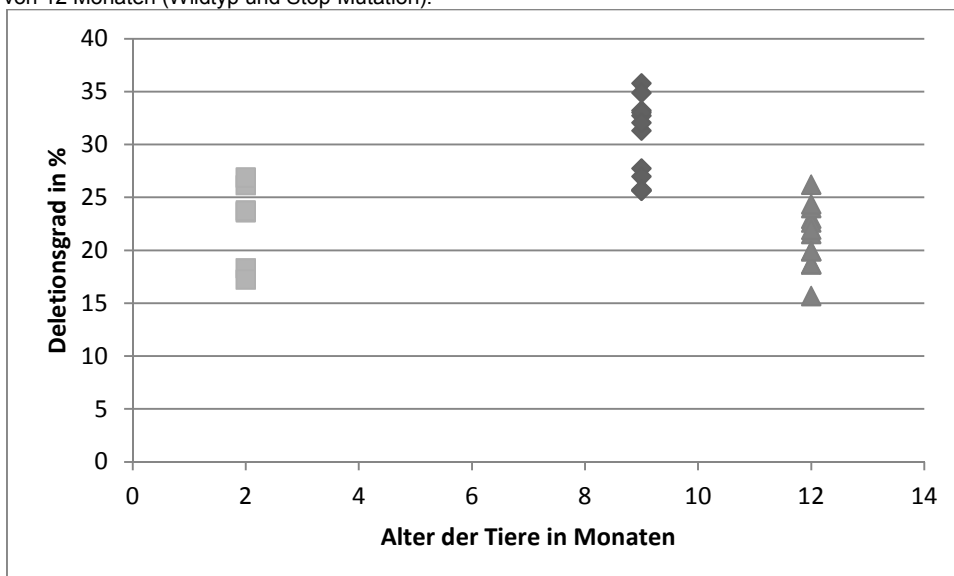


Abb. 4.4.: Deletionsgrade von Knockout- und Wildtyp-Mäusen im zeitlichen Verlauf (6 Tiere im Alter von 2 Monaten, 12 Tiere im Alter von 9 Monaten, 9 Tiere im Alter von 12 Monaten).

Tab. 4.2.: Vergleich des Deletionsgrades von Mäusen unterschiedlichen Alters. Übersicht sämtlicher Ergebnisse mit Standardabweichung und T-Test, signifikante Ergebnisse fett markiert.

| Deletionsgrad | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|------------------|
| Gewebe | Alter | Genotyp | Anzahl der Tiere | Mittelwert | Standardabweichung | T-Test |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 2 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 22,7 | 4,0 | |
| | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 30,4 | 3,8 | 0,001 |
| | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 30,4 | 3,8 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 21,4 | 2,9 | <0,001 |
| | 9 Monate | Wildtyp+Stop-Mutation | 11 | 27,8 | 4,9 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Stop-Mutation | 9 | 20,4 | 4,2 | 0,001 |
| Neurone der Substantia nigra | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 24,3 | 7,9 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 16 | 4,3 | 0,01 |
| Neurone des Hippocampus | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 16,5 | 8,3 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 19 | 11,7 | 0,43 |

4.1.3. Zusammenhang zwischen Deletionsgrad und der anatomischen Region

Die einzelnen untersuchten anatomischen Regionen wurden hinsichtlich des Deletionsgrades der mtDNA miteinander verglichen. Es wurden Knockout-Mäuse und Wildtypen in einer Gruppe zusammengefasst und mit entsprechenden Kohorten anderen Gewebes korreliert.

Hierbei zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des Deletionsgrades in der Substantia nigra sowie im Hippocampus im Vergleich zum Homogenat. Dies war in der Substantia nigra sowohl bei 9 als auch 12 Monate alten Tieren, im Hippocampus lediglich bei 9 Monate alten Tieren zu beobachten (24,3 % ± 7,9% zu 30,4 % ± 3,8 %, 16 % ± 4,3 % zu 21,4 % ± 2,9 %, 16,5 % ± 8,3 % zu 30,4 % ± 3,8%, jeweils p<0,05).

Desweiteren zeigte sich bei 9 Monate alten Tieren eine Tendenz zur Erhöhung des Deletionsgrades in der Substantia nigra im Vergleich zum Hippocampus (24,3 % ± 7,9% zu 16,5 % ± 8,3 %, p=0,06). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.5. und Tab. 4.3. dargestellt.

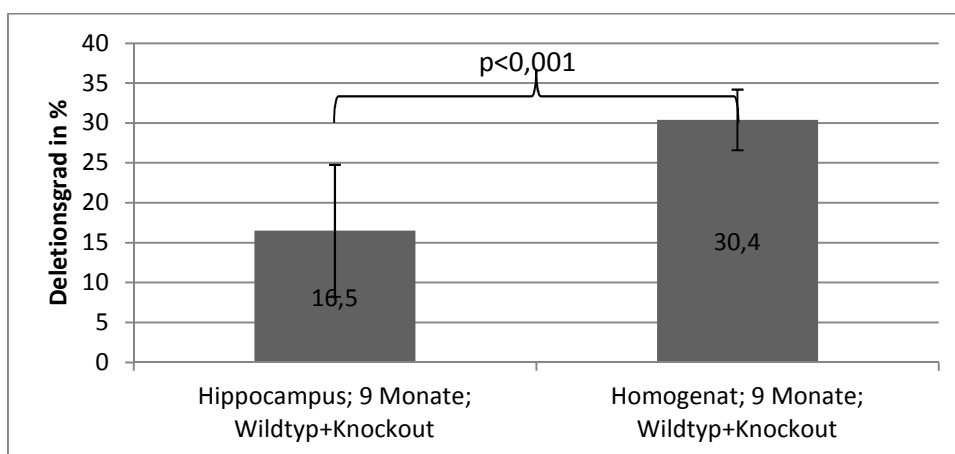


Abb. 4.5.: Repräsentativ für den erhöhten Deletionsgrad im Homogenat die graphische Gegenüberstellung mit den im Hippocampus gemessenen Werten bei Tieren im Alter von 9 Monaten (Hippocampus-Gewebeproben von 6 Tieren, Homogenat von 12 Tieren, jeweils Wildtyp und Knockout).

Tab. 4.3.: Vergleich des Deletionsgrades in verschiedenen Geweben. Übersicht sämtlicher Ergebnisse mit Standardabweichung und T-Test, signifikante Ergebnisse fett markiert.

| Deletionsgrad | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|------------------|
| Gewebe | Alter | Genotyp | Anzahl der Tiere | Mittelwert | Standardabweichung | T-Test |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 30,4 | 3,8 | |
| Neurone der Substantia nigra | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 24,3 | 7,9 | 0,04 |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 21,4 | 2,9 | |
| Neurone der Substantia nigra | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 16 | 4,3 | 0,002 |
| Neurone der Substantia nigra | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 24,3 | 7,9 | |
| Neurone des Hippocampus | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 16,5 | 8,3 | 0,06 |
| Neurone der Substantia nigra | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 16 | 4,3 | |
| Neurone des Hippocampus | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 19 | 11,7 | 0,42 |
| Neurone des Hippocampus | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 16,5 | 8,3 | |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 30,4 | 3,8 | <0,001 |
| Neurone des Hippocampus | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 19 | 11,7 | |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 21,4 | 2,9 | 0,47 |

4.2. mtDNA-Kopienzahl

4.2.1. Zusammenhang zwischen mtDNA-Kopienzahl und Parkin-Expressionsprofil

Darüber hinaus wurde die mtDNA-Kopienzahl mittels quantitativer realtime-PCR untersucht. Das vorhandene Material und die weitere Vorgehensweise entsprechen der in Punkt 4.1.1. beschriebenen Auswertung des Deletionsgrades.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Rein deskriptiv zeigte sich bei 2 Monate alten Mäusen eine Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl im Vergleich zu Wildtypmäusen ($18,7 \pm 14,6$ zu $6,1 \pm 4,0$, $p=0,39$). Diese war nicht signifikant, wobei pro Gruppe aber auch nur 3 Tiere zur Verfügung standen. Die Ergebnisse werden in Abb. 4.6. und Tab. 4.4. dargestellt.

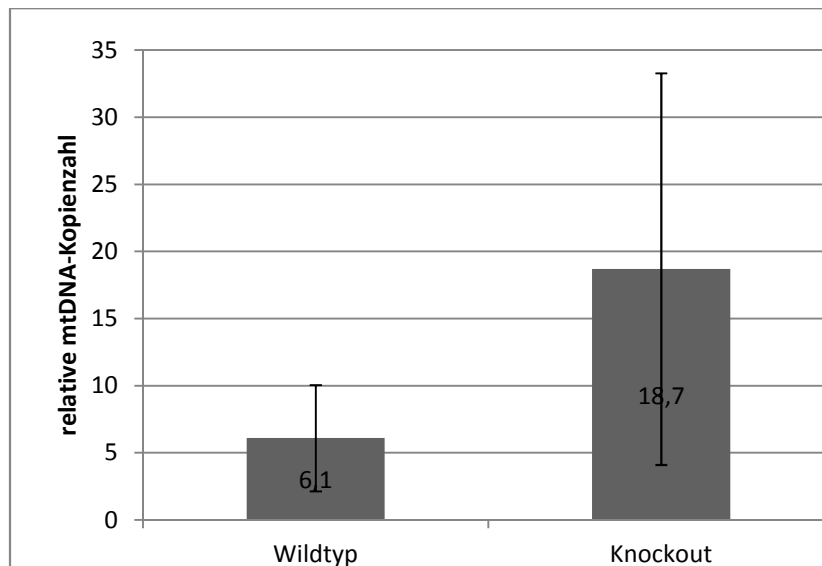


Abb. 4.6.: Erhöhte mtDNA-Kopienzahl im Homogenat bei 2 Monate alten Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtypen. Ergebnisse nicht signifikant, pro Gruppe standen nur 3 Tiere zur Verfügung.

Tab. 4.4.: Vergleich der mtDNA-Kopienzahl von Wildtypen mit Mutanten in verschiedenen Geweben und Altersgruppen. Übersicht sämtlicher Ergebnisse mit Standardabweichung und T-Test.

| mtDNA-Kopienzahl | | | | | | |
|----------------------------------|----------------|----------------|------------------|------------|--------------------|--------|
| Gewebe | Alter | Genotyp | Anzahl der Tiere | Mittelwert | Standardabweichung | T-Test |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 2 Monate | Wildtyp | 3 | 6,1 | 4,0 | |
| | | Knockout | 3 | 18,7 | 14,6 | 0,39 |
| | 9 Monate | Wildtyp | 5 | 0,9 | 0,4 | |
| | | Knockout | 7 | 2 | 2,3 | 0,36 |
| | | Wildtyp | 6 | 2,5 | 2,7 | |
| | | Stop-Mutation | 5 | 0,5 | 0,2 | 0,13 |
| | | Wildtyp | 4 | 4,4 | 0,3 | |
| | | humanes Parkin | 4 | 3,3 | 1,4 | 0,16 |
| | 12 Monate | Wildtyp | 6 | 14,2 | 5,2 | |
| | | Knockout | 6 | 14,7 | 4,6 | 0,87 |
| | | Wildtyp | 5 | 13,2 | 5,2 | |
| | | Stop-Mutation | 4 | 19,8 | 12,3 | 0,3 |
| | Wildtyp | 5 | 8,8 | 6,3 | | |
| | humanes Parkin | 6 | 11,3 | 2,5 | 0,39 | |
| Neurone der Substantia nigra | 9 Monate | Wildtyp | 3 | 2278 | 888 | |
| | | Knockout | 3 | 2585 | 636 | 0,65 |
| | 12 Monate | Wildtyp | 6 | 6120 | 4014 | |
| | | Knockout | 6 | 7636 | 3995 | 0,55 |
| Neurone des Hippocampus | 9 Monate | Wildtyp | 3 | 43920 | 24224 | |
| | | Knockout | 3 | 31699 | 26696 | 0,32 |
| | 12 Monate | Wildtyp | 6 | 66074 | 65358 | |
| | | Knockout | 6 | 43404 | 42993 | 0,23 |

4.2.2. Zusammenhang zwischen mtDNA-Kopienzahl und Alter

Analog zu Punkt 4.1.2. wurde auch die mtDNA-Kopienzahl auf Veränderungen im Alterungsprozess unter Zusammenlegung von Wildtyp und einer Mutationsgruppe untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg von 9 auf 12 Monate, der in Homogenat und Substantia nigra signifikant war ($1,5 \pm 1,8$ zu $14,4 \pm 4,7$, $1,6 \pm 2,2$ zu $16,1 \pm 9,1$, 2431 ± 711 zu 6947 ± 3880 , jeweils $p < 0,05$). Die Ergebnisse werden in Abb. 4.7. und Tab. 4.5. dargestellt.

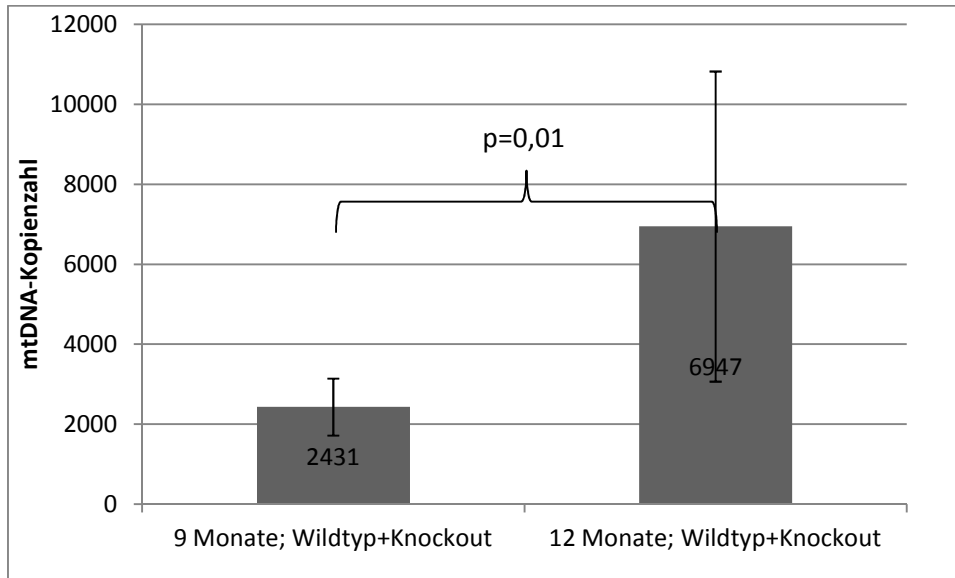


Abb. 4.7.: Repräsentativ für die erhöhte mtDNA-Kopienzahl bei 12 Monate alten Tieren die graphische Gegenüberstellung mit den Werten der 9 Monate alten Tiere in 20 Neuronen der Substantia nigra von sechs 9 Monate alten Tieren und elf 12 Monate alten Tieren.

Tab. 4.5.: Vergleich der mtDNA-Kopienzahl von Mäusen unterschiedlichen Alters. Übersicht sämtlicher Ergebnisse mit Standardabweichung und T-Test, signifikante Ergebnisse fett markiert.

| mtDNA-Kopienzahl | | | | | | |
|----------------------------------|-----------|------------------------------|------------------|------------|--------------------|--------|
| Gewebe | Alter | Genotyp | Anzahl der Tiere | Mittelwert | Standardabweichung | T-Test |
| Homogenat des Bulbus olfactorius | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 1,5 | 1,8 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 14,4 | 4,7 | <0,001 |
| | 9 Monate | Wildtyp+Stop-Mutation | 11 | 1,6 | 2,2 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Stop-Mutation | 9 | 16,1 | 9,1 | <0,001 |
| Neurone der Substantia nigra | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 2431 | 711 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 6947 | 3880 | 0,01 |
| Neurone des Hippocampus | 9 Monate | Wildtyp+Knockout | 6 | 37810 | 25516 | |
| | 12 Monate | Wildtyp+Knockout | 12 | 54740 | 55721 | 0,23 |

4.3. Untersuchung der Mitochondrienzahl mittels Western Blot

Mittels Western Blot wurden in den Proben zwei Proteine untersucht, Actin- β und VDAC. Actin- β diente der Qualitätskontrolle, VDAC wurde als Marker für die Menge der Mitochondrien verwendet. Bei jedem Versuch wurden Wildtyp und ein genetisch manipuliertes Modell gegenüber gestellt. In jedem Well war das Actin- β -Signal gleich intensiv, was für eine überall identische Proteinmenge

spricht und eine korrekte Durchführung des Versuchs bestätigt. Für VDAC waren die Signale ebenfalls ohne Unterschied, lediglich bei der 9-Monats-Gruppe der Knockout-Mäuse liegt ein leicht stärkeres Signal als bei der Vergleichsgruppe vor (s. Abb. 4.8. und 4.9.).

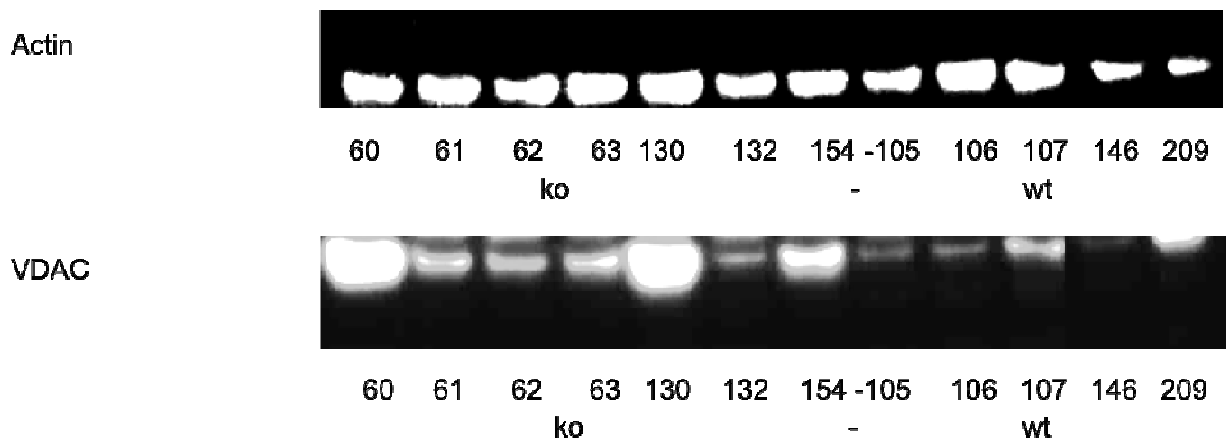


Abb. 4.8.: Western Blot für VDAC in 5 Wildtyp- und 7 Knockout-Mäusen im Alter von 9 Monaten mit Signalsteigerung bei den Knockout-Mäusen. 1. Ak 1:1000, 2. Ak 1:5000, Belichtungszeit 498 Sekunden. Gleiche Intensität des Actin- β -Signals bei allen Tieren als Nachweis einer identischen Protein-Menge.

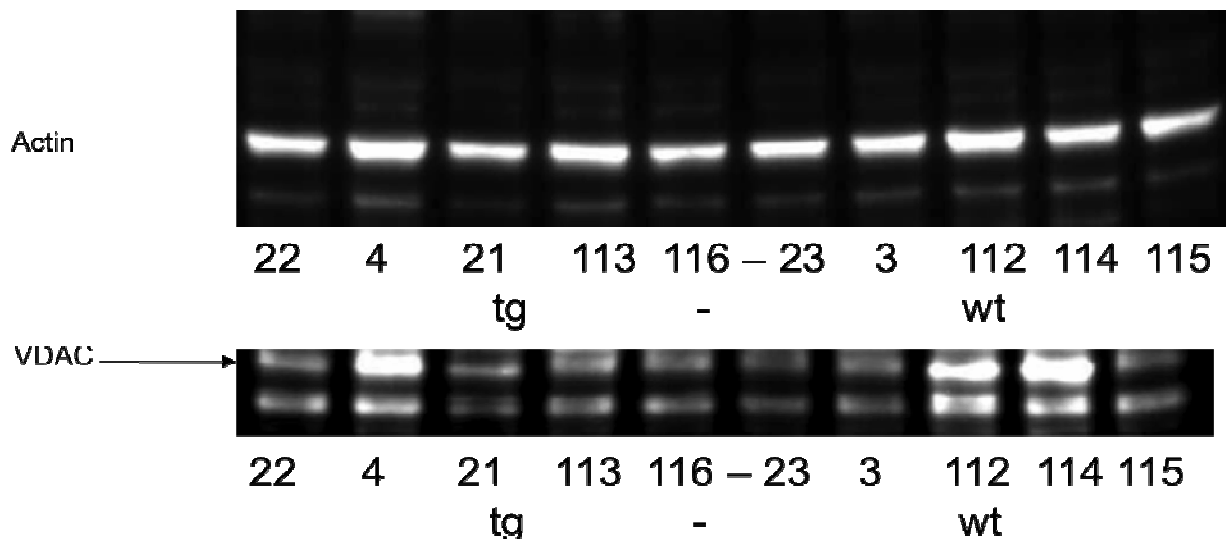


Abb. 4.9.: Western Blot für VDAC in 5 Wildtyp- und 5 Stop-Mäusen im Alter von 12 Monaten mit überall ähnlicher Signalintensität. 1. Ak 1:1000, 2. Ak 1:5000, Belichtungszeit 362 Sekunden. Gleiche Intensität des Actin- β -Signals bei allen Tieren als Nachweis einer identischen Protein-Menge.

4.4. Zusammenfassung der Befunde

Abschließend sollen die Befunde zusammengefasst dargestellt werden: Bei 2 Monate alten Tieren zeigte sich fraglich eine erhöhte mtDNA-Kopienzahl in Knockout-Tieren, der T-Test war nicht signifikant bei jeweils nur 3 Tieren. Bei älteren Tieren ist diese Tendenz nicht nachweisbar. Es zeigt sich jedoch im Western Blot ein stärkeres VDAC-Signal als Zeichen einer vermehrten Mitogenese bei 9 Monate alten Tieren. Bei 12 Monate alten Tieren sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Eine zusätzliche Expression von humanem Parkin führte nach 12 Monaten zu einem erhöhten Deletionsgrad im Homogenat, eine human-pathogene Stop-Mutation hatte keinen signifikanten Effekt. Tab. 4.6. zeigt einen Überblick über die Befunde.

Tab. 4.6.: Übersicht über alle Befunde der mutierten Genotypen im Vergleich zu Wildtyp. ↑ = erhöht; ↓ = erniedrigt; ↔ = kein Unterschied; n.d. = nicht durchgeführt

| | Gewebe | 2 Monate | | | 9 Monate | | | 12 Monate | | |
|----------------|----------------------------------|---------------|------------------|--------------|---------------|------------------|--------------|---------------|------------------|--------------|
| | | Deletionsgrad | mtDNA-Kopienzahl | Western Blot | Deletionsgrad | mtDNA-Kopienzahl | Western Blot | Deletionsgrad | mtDNA-Kopienzahl | Western Blot |
| Knockout | Homogenat des Bulbus olfactorius | ↔ | ↔ | n.d. | ↔ | ↔ | ↑ | ↔ | ↔ | ↔ |
| | Hippocampus-Neurone | n.d. | n.d. | n.d. | ↔ | ↔ | n.d. | ↔ | ↔ | n.d. |
| | Substantia nigra-Neurone | n.d. | n.d. | n.d. | ↔ | ↔ | n.d. | ↔ | ↔ | n.d. |
| Stop-Mutation | Homogenat des Bulbus olfactorius | n.d. | n.d. | n.d. | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ |
| humanes Parkin | Homogenat des Bulbus olfactorius | n.d. | n.d. | n.d. | ↔ | ↔ | ↔ | ↑ (p=0,02) | ↔ | ↔ |

Unabhängig von der Parkin-Expression nahm der Deletionsgrad zwischen dem zweiten und dem neunten Monat zu, um dann danach bis zum zwölften Monat in Homogenat und Substantia nigra wieder abzufallen wie in Tab. 4.7. dargelegt. Weiterhin zeigte sich ein Anstieg der mtDNA-Kopienzahl von 9 auf 12 Monate in Homogenat und Substantia nigra. Im Hippocampus war dies nicht feststellbar.

Tab. 4.7.: Vergleich der Deletionsgrade und der mtDNA-Kopienzahl unterschiedlicher Altersgruppen. Die Auffälligkeiten werden aus Sicht der in der jeweiligen Zeile in der ersten Spalte genannten Altersgruppe in Bezug auf die 9 Monate alte Gruppe dargestellt.

| 9 Monate | | | |
|-----------|---|---------------|------------------|
| | Gewebe | Deletionsgrad | mtDNA-Kopienzahl |
| 2 Monate | Homogenat des Bulbus olfactorius; Wildtyp+Knockout | ↓ (p=0,001) | n.d. |
| 12 Monate | Homogenat des Bulbus olfactorius; Wildtyp+Knockout | ↓ (p<0,001) | ↑ (p<0,001) |
| 12 Monate | Homogenat des Bulbus olfactorius; Wildtyp+Stop | ↓ (p=0,001) | ↑ (p<0,001) |
| 12 Monate | Einzelzellen der Substantia nigra; Wildtyp+Knockout | ↓ (p=0,01) | ↑ (p=0,01) |
| 12 Monate | Einzelzellen des Hippocampus; Wildtyp+Knockout | ↔ | ↔ |

Insgesamt waren die Deletionsgrade im Homogenat höher als auf Einzelzellebene in Substantia nigra und Hippocampus, die Ergebnisse werden in Tab. 4.8. gezeigt.

Tab. 4.8.: Vergleich der Deletionsgrade der unterschiedlichen Gewebe. Die Auffälligkeiten werden aus Sicht der in der jeweiligen Zeile in der ersten Spalte genannten Region in Bezug auf die in der jeweiligen Spalte oben genannte Region dargestellt.

| | Deletionsgrad | | | |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| | Homogenat 9 Monate | Homogenat 12 Monate | Hippocampus 9 Monate | Hippocampus 12 Monate |
| Einzelzellen des Hippocampus | ↓ (p<0,001) | ↔ | --- | --- |
| Einzelzellen der Substantia nigra | ↓ (p=0,04) | ↓ (p=0,002) | ↑ (p=0,06) | ↔ |

5. Diskussion

Wie in der Einleitung dargelegt, könnten die mitochondriale Integrität und die Qualität der mtDNA eine bedeutende Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist das Protein Parkin, das bei familiären und sporadischen Fällen des Parkinson-Syndroms mutiert ist [59]. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich Veränderungen der Parkin-Expression auf die Biogenese und Deletionen der mtDNA auswirken. Es zeigte sich bei 2 Monate alten Tieren fraglich eine erhöhte mtDNA-Kopienzahl in Knockout-Tieren sowie im Western Blot ein visuell stärkeres VDAC-Signal als Zeichen einer vermehrten Mitogenese bei 9 Monate alten Knockout-Tieren. Bei 12 Monate alten Mäusen mit zusätzlicher Expression von humanem Parkin zeigte sich ein erhöhter Deletionsgrad im Homogenat, eine human-pathogene Stop-Mutation hatte keinen signifikanten Effekt. Der Deletionsgrad nahm unabhängig vom Genotyp zwischen dem zweiten und dem neunten Monat zu und fiel bis zum zwölften Monat wieder ab. Weiterhin zeigte sich ein Anstieg der mtDNA-Kopienzahl von 9 auf 12 Monate in Homogenat und Substantia nigra. Die Deletionsgrade im Homogenat waren höher als auf Einzelzellebene in Substantia nigra und Hippocampus.

5.1. Einfluss der Parkin-Expression auf Biogenese und Deletionsgrad

5.1.1. Vermehrte Biogenese bei jungen Mäusen mit Parkin-Knockout

Bei jüngeren Tieren zeigte sich mit der Tendenz zur Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl bei 2 Monate alten Tieren und dem verstärkten VDAC-Signal bei 9 Monate alten Tieren ein Hinweis auf eine verstärkte mitochondriale Biogenese. Dieser Befund könnte als Kompensationsmechanismus gegen den Parkin-Knockout gedeutet werden. Kompensation ist ein bekanntes Phänomen in neurodegenerativen Erkrankungen [51] und wird insbesondere in Mausmodellen regelmäßig beobachtet, in denen sie häufiger auftritt als in niedriger entwickelten Tieren wie *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* [113]. Beispielsweise zeigten Parkin-Knockout-Mäuse erhöhte Level von Glutathion [81] und in DJ-1-Knockout-Mäusen wurde eine erhöhte Aktivität der mitochondrialen Glutathion-Peroxidase gefunden [114]. Kompensationsmechanismen gelten auch als mögliche Erklärung für die unzureichende Entwicklung von Pathologien in Parkin-Tiermodellen, indem die dopaminergen Neurone durch intrinsische protektive Faktoren und genetische Modifikationen Resistenzen gegen Mutationen entwickeln könnten [51].

Die Hochregulation der mtDNA-Kopienzahl wurde bereits als eine mögliche Kompensationsstrategie gegen mitochondriale Dysfunktion bei mitochondrialen Erkrankungen beobachtet [115]. Die Vermehrung der Anzahl an Mitochondrien kann hier bis zu einem gewissen Maße eine erfolgreiche Gegenregulation darstellen und mtDNA-Mutationen kompensieren [115].

Eine Hochregulation der mtDNA-Kopienzahl war in mehreren Studien assoziiert mit vermehrtem oxidativen Stress, beispielsweise im Blut von Dialyse-Patienten [116] und in humanen Mesangium-Zellen [117]. Diese Hochregulation könnte als Kompensationsmechanismus gegen mtDNA-

Schäden gewertet werden [117]. Die Bedeutung der Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl wird unterstrichen durch den Versuch, sie therapeutisch zu nutzen. So könnte sie bei der Behandlung der hypertensiven Herzerkrankung von Nutzen sein [118]. In einer Medikamentenstudie zur Behandlung von Bluthochdruck, Übergewicht und Diabetes wurde eine Hochregulation der mtDNA-Kopienzahl gezeigt, die begleitet war von einer Abnahme des oxidativen Stress' [119].

Entsprechend ist es denkbar, dass auch die in dieser Arbeit untersuchten Tiere einen Kompensationsmechanismus entwickelten, der in einer Hochregulation der Mitogenese bestehen könnte. Wie in der Einleitung unter Punkt 1.3.3. dargelegt, wird Parkin eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle durch Mitophagie, unter anderem über seine Interaktion mit dem Mikrotubulus-System und dem Fusions-Fissions-Apparat, und an der mtDNA-Reparatur mittels TFAM zugeschrieben [33]. Ein Ausfall dieser Funktionen durch Ausschaltung des Parkin-Gens könnte daher für die Zelle das Risiko eines erhöhten Anteils dysfunktionaler Mitochondrien bergen und zellschädigend wirken, weshalb sie Maßnahmen zur Verbesserung der mitochondrialen Qualität ergreifen müsste. Der Schweregrad zellulärer Dysfunktion und Krankheit wird maßgeblich beeinflusst vom Verhältnis mutierter mtDNA zu Wildtyp-mtDNA und die Verschiebung des Verhältnisses zu einem größeren Anteil von Wildtyp-mtDNA verbessert die mitochondriale Funktion [120]. Daher würde eine erhöhte Produktion neuer Mitochondrien zwar nicht die Menge, jedoch über einen Verdünnungseffekt den relativen Anteil defekter Mitochondrien reduzieren und so zellschützend wirken können. Somit stellt sie einen möglichen Mechanismus dar, mit dem die Zelle die Qualität der Mitochondrien verbessern könnte.

Auffallend an unseren Ergebnissen ist die Abhängigkeit der Befunde vom Alter der Tiere. Während sich bei jungen Tieren Hinweise auf eine vermehrte Mitogenese finden lassen, sind die Resultate nach 12 Monaten unauffällig. Bereits früher wurde angenommen, dass das Versagen von Kompensationsmechanismen ein typisches Phänomen im Alterungsprozess ist [121] und die Effektivität kompensatorischer Maßnahmen altersabhängig ist: Junge Mäuse reagierten auf einen Knockout von Parkin mit der Erhöhung von Stressproteinen, während alte Tiere hierzu nicht in der Lage waren und einen klinischen Phänotyp entwickelten [122]. Dementsprechend könnten Kompensationsmechanismen bzw. deren Versagen ein wichtiger Aspekt in der demographischen Verteilung des Morbus Parkinson sein, da es erst bei Menschen fortgeschrittenen Alters, nachdem die Zellen über einen langen Zeitraum die Störungen des Metabolismus korrigieren konnten, zur Neurodegeneration kommt [78].

In einer Arbeit über Parkinson-Mausmodelle wurde postuliert, dass bei Knockout eines Parkinson-assoziierten Gens ein Kompensationsmechanismus implementiert wird, der die Funktion des Gens in der Zelle möglichst gut imitiert [113]. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Überlegungen könnte die Hochregulation der mtDNA-Kopienzahl als eine zelluläre Antwort auf den Parkin-Knockout, deren Effektivität im Laufe des Lebens nachlässt, erklärt werden. Unter dieser Annahme müsste man dann allerdings davon ausgehen, dass der entscheidende pathophysiologische Mechanismus von Parkin-Knockouts bei der Entstehung eines Parkinson-

Syndroms nicht in der Biogenese liegt, da diese ja offensichtlich intakt ist und sogar gesteigert wird, um das Fehlen von Parkin zu kompensieren. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wäre es interessant, die Qualität der neu gebildeten Mitochondrien zu beurteilen.

5.1.2. Akkumulation von Deletionen bei Mäusen, die humanes Parkin exprimieren

In dieser Arbeit zeigte sich ein erhöhter Deletionsgrad bei Tieren, die zusätzlich humanes Parkin exprimierten. Verschiedene Studien an Tiermodellen von Maus und Drosophila sowie Zellkulturen berichten übereinstimmend, dass die Überexpression von Parkin einen neuroprotektiven Effekt hat [55, 56, 86, 92, 120]. In all diesen Studien wurden lediglich einmal explizit mtDNA-Deletionen untersucht. Dabei wurde eine Erhöhung des Anteils nicht-mutierter mtDNA in humanen Zybrid-Zellen nach Parkin-Überexpression beobachtet, wobei die mtDNA mittels RFLP-PCR untersucht wurde und keine Aussage über die Art der DNA-Mutation gemacht werden konnte [120]. Vor diesem Hintergrund musste also im Widerspruch zu unseren Ergebnissen von einer neuroprotektiven Wirkung der Überexpression von Parkin ausgegangen werden, die sich möglicherweise auch in einer Verbesserung der Qualität der mtDNA manifestiert. Allerdings wurden in den meisten dieser Untersuchungen Tiermodelle und Zellkulturen verwendet, die sich durch eine genetische Manipulation oder Exposition gegen toxische Substanzen in einem Zustand unphysiologischer Belastung befanden.

In einer aktuellen Untersuchung an Ratten und Mäusen wurde eine Toxizität von Wildtyp-Parkin beobachtet [80]. Den Tieren wurde humanes mutiertes und Wildtyp-Parkin stereotaktisch in die Substantia nigra injiziert, was zu einer Hochregulation von Parkin selektiv in den dopaminergen Neuronen führte. In der Nachbeobachtung der Tiere bis zu 8 Monate nach der Injektion zeigte sich bei beiden Parkin-Varianten der dosisabhängige Untergang von Neuronen in der Substantia nigra sowie von Axon-Terminalen im Striatum. Das Ausmaß der Neurodegeneration war bei Wildtyp-Parkin und in Mäusen milder ausgeprägt bzw. nicht festzustellen [80]. Zwar konnte bei den Mäusen keine durch Wildtyp-Parkin ausgelöste Neurodegeneration beobachtet werden, jedoch zeigt der Nachweis dieses Effektes bei Ratten das toxische Potential von Parkin. Möglicherweise hätte die Injektion einer höheren Dosis bei den Mäusen zu einem ähnlichen Ergebnis geführt. Desweiteren ist es vorstellbar, dass in dieser Studie subklinische Pathologien auf molekularer Ebene hätten festgestellt werden können, die jedoch nicht untersucht wurden. Als mögliche Pathomechanismen wurden verschiedene Erklärungen vorgeschlagen: Ein hohes Expressionslevel von Wildtyp-Parkin könnte die Proteasomen durch Überladung mit ubiquitinierten Substraten überfordern und die Degradation anderer neurotoxischer Substanzen vermindern [80]. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass Wildtyp-Parkin zu proteasomaler Dysfunktion führen kann [123]. Auch eine überschießende Elimination von Mitochondrien wird für möglich gehalten [80]. Beiden Erklärungsansätzen liegt die Annahme zugrunde, dass eine Überexpression von Parkin zu einer unphysiologischen Überfunktion führt, die zellschädigende Effekte zeigt. Die Autoren gehen infolge dieser Beobachtungen davon aus, dass es für Parkin nur

einen relativ geringen physiologischen Bereich gibt, in dem es protektiv wirkt, und warnen vor einer voreiligen unkritischen klinischen Anwendung der Parkin-Überexpression als therapeutischer Strategie für den Morbus Parkinson [80, 123]. Sollte die proteasomale Dysfunktion tatsächlich der Grund für die beobachtete vermehrte Neurodegeneration sein, so wäre sie gleichzeitig eine potentielle Erklärung für die in dieser Arbeit festgestellte Zunahme des Deletionsgrades. Eine Hemmung des UPS fördert die Aggregation von Parkin [124], wodurch dessen Mobilität in der Zelle beeinträchtigt wird [57]. Diese ist nötig, um zu defekten Mitochondrien zu gelangen [57]. Eventuell kann es aufgrund dessen seiner Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle nicht mehr gerecht werden, was in einer Erhöhung des Deletionsgrades münden könnte.

Somit unterstützt unsere Arbeit die hier genannte, kürzlich veröffentlichte Studie, die eine schädliche Wirkung einer unphysiologischen Überexpression von Parkin für möglich hält.

Dennoch muss berücksichtigt werden, dass, wie zu Beginn dieses Abschnitts aufgeführt, bisher überwiegend neuroprotektive Effekte der Parkin-Überexpression beobachtet wurden. In unserer Arbeit zeigt sich zwar eine leichte Erhöhung des Deletionsgrades, jedoch zeigten die Mäuse phänotypisch keine weiteren Auffälligkeiten. Auch sind die in unserer Arbeit gemessenen Deletionsgrade in der Größenordnung von 10-30 % weit entfernt von den Werten, die als pathogenetisch bedeutsam angesehen werden (50-60 %) [34]. Eine klinische Relevanz der von uns gefundenen leichten Erhöhung des Deletionsgrades kann daher nicht zwingend postuliert werden.

5.1.3. Keine Auswirkungen der Stop-Mutation

Im Gegensatz zu den oben diskutierten Parkin-Modellen fanden wir bei Mäusen mit Expression einer human-pathogenen Stop-Mutation keine Veränderungen der mtDNA-Kopienzahl oder des Deletionsgrades. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es wie in Kap. 1.3.2.2. dargelegt eine Vielzahl von Mutationen im Parkin-Gen gibt, weshalb entsprechend unterschiedliche molekulare Pathomechanismen den jeweiligen Mutationen zugrunde liegen können. Für die hier untersuchte Mutation wurde gezeigt, dass sie sich spontan fehlfaltet und zur Aggregation neigt sowie eine gestörte Interaktion mit der Zellmembran aufweist [63]. Sie könnte die Integrität der zweiten RING-finger-domain zerstören und so trotz erhaltener enzymatischer Aktivität die Ubiquitinierung stören [62].

Es besteht die Möglichkeit, dass die Mäuse auf die Manipulation bereits ab ihrem Embryonalstadium mit Kompensationsmechanismen reagiert haben. In Punkt 5.1.1. werden diese bereits als weit verbreitetes Phänomen in neurodegenerativen Tiermodellen vorgestellt. Viele vorangegangene Studien konnten möglicherweise aus diesem Grund trotz Parkin-Knockouts keinen kompletten Parkinson-Phänotyp in den Tieren induzieren [51]. Es gibt mehrere Mechanismen zur Kompensation der mitochondrialen Defekte [52, 74]. Folglich könnten der in Punkt 5.1.1. diskutierte Knockout von Parkin und die Expression einer pathogenen Mutante zu unterschiedlichen zellulären Kompensationsmechanismen führen. Parkin ist an der Regulation von

mitochondrialen Biogenese und Zelltod über den PGC-1 α -/NRF-1- und den wnt-Signalweg beteiligt [78, 125, 126]. Es wird die Existenz eines die mitochondriale Biogenese beeinflussenden, Parkin-unabhängigen Mechanismus angenommen, der im Falle eines Parkin-Knockouts aktiviert werden kann und über die Regulation von PGC-1 α und NRF-1 abläuft [78]. Der ebenfalls von Parkin beeinflusste wnt-Signalweg ist ein bedeutender Mechanismus der Gen-Expression, der von Parkin-Mutanten, jedoch nicht von Knockouts reguliert werden kann [126, 127]. So reagieren möglicherweise sowohl Parkin-Mutanten als auch Knockouts mit einer Gegenregulation, wobei die Parkin-Mutanten bei erhaltenem wnt-Signalweg physiologische Level bei mtDNA-Deletionen und mtDNA-Kopienzahl erreichen, während es bei Knockouts durch die Aktivierung anderer Stoffwechselwege zu Abweichungen dieser Parameter kommt.

5.1.4. Kritische Bewertung der Ergebnisse

5.1.4.1. Methodische Limitierungen

Die realtime-PCR ist prinzipiell eine sehr gute Technik für die in dieser Untersuchung durchgeführten Experimente und erzielt bei der Analyse von mtDNA qualitativ ähnliche Ergebnisse wie der Southern Blot oder die longrange PCR [103].

Allerdings hat auch die realtime-PCR methodische Begrenzungen. Die Bestimmung der Deletionsgrade und der mtDNA-Kopienzahl beruht auf einer Messung von C_t -Werten in der PCR und deren Berechnung in einer Formel, in der die Differenz der Differenz von C_t -Werten exponentiell eingeht. Dadurch können bereits kleine Variationen des C_t -Wertes zu einem abweichenden Ergebnis führen. Durch die Amplifikation jedes Gens in einem anderen Well wird die Anzahl der Pipettierschritte erhöht und das Risiko von Ungenauigkeiten beim Pipettieren steigt. Mit einer 2014 veröffentlichten Methode, bei der diese methodische Schwäche dadurch, dass alle Gene in einem Well amplifiziert werden, behoben wird, ist es möglich, Deletionsunterschiede ab einer Differenz von 5,9 % zu detektieren [128]. Die in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede liegen etwa in dieser Größenordnung, weshalb die Möglichkeit besteht, dass es durch Messungenauigkeiten zu einer Verzerrung der Realität kam. Auch bezüglich der mtDNA-Kopienzahl ist Vorsicht bei der Interpretation geboten, da die natürliche Variation bereits sehr groß ist [47]. Zwar wurde versucht, diese Fehleranfälligkeit durch Mehrfachbestimmung der Werte zu minimieren, allerdings kann insbesondere im Zusammenhang mit der geringen Anzahl an Proben nicht ausgeschlossen werden, dass falsch positive Befunde erhoben wurden. Die meisten erhobenen Befunde können theoretisch hinreichend erklärt werden und sind auch in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen. Jedoch wäre gerade im Hinblick auf schwieriger zu erklärende Ergebnisse wie der Abnahme des Deletionsgrades im Alterungsprozess (Punkt 5.2.1.) eine Revalidierung mittels weiterer Untersuchungen, die eine größere Anzahl an Tieren und verschiedene Untersuchungstechniken kombinieren, wünschenswert.

5.1.4.2. Rolle der mtDNA in der Pathogenese des Morbus Parkinson

Darüber hinaus muss beachtet werden, dass noch nicht sicher beurteilt werden kann, welche Rolle mtDNA-Deletionen in der Pathogenese des Morbus Parkinson zukommt. Auf der einen Seite wurden zwar bei Parkinson-Patienten vermehrt mtDNA-Deletionen gefunden [38] und transgene Mäuse mit Herabregulation der mtDNA durch Knockout von TFAM entwickelten ein Parkinson-Syndrom [41]. Allerdings darf auf der anderen Seite auch nicht außer Acht gelassen werden, dass, obwohl über 100 Mutationen der mtDNA bekannt sind, nur wenige Assoziationen zwischen neurodegenerativen Prozessen und primären Mutationen der mtDNA bestehen [125]. Zudem führen hohe Anteile mutierter mtDNA, beispielsweise bei Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom, nicht zwangsläufig zu einem Parkinson-Syndrom [36].

Also ist es durchaus möglich, dass Pathologien der mtDNA nicht bzw. nicht alleine der entscheidende Schritt in der Entstehung des Morbus Parkinson sind. Alternativ könnten anderen Mechanismen wie Defekten der mitochondrialen Dynamik und der Qualitätskontrolle im neurodegenerativen Prozess eine größere Bedeutung zukommen [36].

5.1.4.3. Vorschläge für zukünftige Studien

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit eher geringe Veränderungen der mtDNA bei Alteration der Parkin-Expression erhoben werden. Möglicherweise wären mit einer anderen Vorgehensweise die Ergebnisse eindeutiger gewesen. Beispielsweise hätten sowohl Parkin als auch der aus dem Parkin-Mangel folgende Kompensationsmechanismus in einem Versuch ausgeschaltet werden können. In einem Modell mit Mutationen von Twinkle konnte ein Zusammenhang zwischen niedrigen Parkin-Konzentrationen, Degeneration dopaminerger Neurone und erhöhten mtDNA-Deletionsgraden dokumentiert werden [129]. Dabei handelte es sich jedoch nicht um einen gezielten Knockout von Parkin, sondern um eine Konzentrationsverminderung als Folge einer Twinkle-Mutation [129].

Eventuell wäre es auch möglich gewesen, Effekte auf die mtDNA zu detektieren, wenn die Tiere zusätzlich zur Genmanipulation weiteren Stressoren ausgesetzt gewesen wären. Es gibt mehrere Beispiele, die zeigen, dass teilweise Effekte erst durch die Exposition mutierter Tiere gegen Umweltstressoren auftreten [130-134]. Deshalb ist es denkbar, dass auch in dieser Arbeit eine Intoxikation bis dato verborgene Effekte hätte aufdecken können.

Vielleicht hätte man darüber hinaus auch durch die Untersuchung älterer Tiere noch weitere Befunde erheben können. Die ältesten untersuchten Tiere in unserer Arbeit waren 12 Monate alt, bezogen auf die Lebenserwartung entspricht dies einem 40 Jahre alten Menschen. Außerdem ist die Lebensphase der reproduktiven Seneszenz ein Abschnitt, der im Leben einer Maus relativ langsam verläuft (8,8 Tage entsprechen einem Menschen-Jahr) und mit etwa 15 Monaten endet, während das darauffolgende Greisenalter bei der Maus einen schnelleren Verlauf nimmt (2,1 Tage entsprechen einem Menschen-Jahr) [135]. Somit waren die von uns untersuchten Mäuse in einem mittleren Erwachsenenalter und in einem Lebensalter, in dem bei der Maus die Alterung nur

langsam voranschreitet. Daher ist es denkbar, dass bei älteren Tieren vielleicht doch noch pathologische Effekte hätten auftreten können. Desweiteren ist die Aussagekraft der Ergebnisse auch durch die teilweise recht niedrige Tieranzahl pro Untergruppe eingeschränkt.

5.2. Einfluss des Alters auf Deletionsgrad und mtDNA-Kopienzahl

Neben der Untersuchung der Auswirkung der Parkin-Expression auf die mtDNA, die die eigentliche Aufgabenstellung war, konnte nebenbefundlich beobachtet werden, dass die Deletionsgrade zunächst altersabhängig von 2 auf 9 Monate zunehmen, um dann wieder abzufallen. Desweiteren stieg die mtDNA-Kopienzahl zwischen 9 und 12 Monaten an.

Im folgenden Abschnitt werden beide Befunde in eigenen Kapiteln diskutiert und gewertet.

5.2.1. Verlauf der Deletionsgrade im Alterungsprozess

In mehreren publizierten Studien wurden bis zu 32 Mäuse im Alter von 2 Wochen bis 35 Monaten bezüglich mtDNA-Deletionen untersucht [136-139]. In allen diesen Untersuchungen nahm der Deletionsgrad im ZNS mit dem Alterungsprozess zu, auch wenn bei diesen Untersuchungen eine große Divergenz der Deletionsgrade festzustellen war [136-139]. Teilweise war das Gehirn das vergleichsweise am wenigsten betroffene Organ [137, 140], teilweise das am stärksten betroffene [136, 141]. Auch beim Menschen konnte mehrfach eine Akkumulation der Deletionen im Alterungsprozess, von der auch das Nervengewebe betroffen war [142, 143], nachgewiesen werden [144].

Theoretisch wäre es durchaus erklärbar, eine Abnahme des Deletionsgrades in Neuronen im Alterungsprozess zu beobachten. In einer Untersuchung verschiedener Hirnregionen wurde in den Basalganglien nach einer initialen Zunahme des Deletionsgrades das Erreichen eines Grenzwertes beobachtet [144]. Diese Beobachtung wurde damit erklärt, dass es einen Mechanismus gegen die Zunahme von mtDNA-Deletionen gibt. Zum Beispiel könnten Zellen, die zu sehr durch oxidativen Stress belastet sind, durch Apoptose eliminiert werden [144]. Zusätzlich ist festzustellen, dass pro Lebensdekade etwa 5-10 % der dopaminergen Neurone im normalen Alterungsprozess untergehen und dieser Verlust bei Patienten mit Parkinson-Syndrom noch ausgeprägter ist [25]. Wenn also im Laufe des Lebens immer mehr Neurone durch Apoptose eliminiert werden und diese Apoptose bevorzugt Zellen mit vermehrter mtDNA-Schädigung betrifft, so ist davon auszugehen, dass auf Einzelzellebene der Deletionsgrad im Alter rückläufig ist oder wenigstens stagniert. Möglicherweise unterscheiden sich die Ergebnisse dieser Arbeit deshalb von vorangegangenen Untersuchungen, weil in jenen Homogenate untersucht wurden, die neben Neuronen auch sämtliche andere Zellen wie Gefäßendothelzellen und Zellen des Immunsystems enthalten, weshalb man darin überwiegend nichtneuronale Mitochondrien vorfindet [145]. In dieser Arbeit wurden selektiv Neurone untersucht bzw. mit dem Bulbus olfactorius eine Region, die einen großen Anteil dopaminergener Neurone enthält [146]. In einer Untersuchung von Hirnstammkernen

und Hippocampus wurde eine Abnahme des Deletionsgrades in Mäusen beobachtet, wobei sich der Beobachtungszeitraum allerdings nur über eine 16-wöchige Periode erstreckte [147]. Bei einer Analyse der Substantia nigra wurde ebenfalls eine Abnahme des Deletionsgrades festgestellt, es standen jedoch lediglich zwei Tiere zur Verfügung. Dennoch halten die Autoren dieser Publikation eine entscheidende Rolle von mtDNA-Mutationen im murinen Alterungsprozess für unwahrscheinlich [140]. Die Datenlage zu den spezifischen Hirnregionen ist somit unklar, stimmt jedoch möglicherweise mit den vorliegenden Ergebnissen überein.

5.2.2. Verlauf der mtDNA-Kopienzahl im Alterungsprozess

Die bisherigen Befunde zu diesem Thema sind uneinheitlich und es konnte noch keine klare Assoziation zwischen mtDNA-Menge und dem Alter gezeigt werden [141]. Aus der Heterogenität der Datenlage wurde geschlossen, dass die mtDNA-Kopienzahl gewebs- als auch speziesspezifisch variabel ist [43]. In Ratten wurde in mehreren anatomischen Regionen, unter anderem im ZNS, ein altersabhängiger Anstieg der mtDNA-Kopienzahl gemessen [148], eine andere Studie erbrachte einen Abfall bzw. konstante Werte. Hier wurde das ZNS allerdings nicht untersucht [149]. In Mäusen wurden heterogene Befunde in verschiedenen Organen erhoben. Es divergieren jedoch auch die Ergebnisse von Untersuchungen, die sich nur auf das Gehirn konzentrierten [141]. Bei Untersuchungen von Menschen zeigte sich ebenfalls ein uneinheitliches Bild [141].

Unter Punkt 5.1.1. wurde bereits die Hochregulation der mtDNA-Kopienzahl als Kompensationsmechanismus vorgestellt. Die Erhöhung des oxidativen Stress könnte eine zelluläre Belastung im Alterungsprozess darstellen, die die Etablierung von Kompensationsmechanismen erfordert [150]. Vor diesem Hintergrund erscheint es gut nachvollziehbar, dass sich mit zunehmendem Alter auch die mtDNA-Kopienzahl erhöht, jedoch ist die Datenlage hierzu heterogen.

5.2.3. Vergleichbarkeit des Alterungsprozesses von Maus und Mensch

Inwieweit bezüglich des Alterungsprozesses Analogien zwischen Mensch und Maus bestehen, muss weiter evaluiert werden. Zwar zeigt die Maus große Ähnlichkeiten mit dem Menschen bezüglich genomischer Eigenschaften und auch im mitochondrialen Genom zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung [141]. Jedoch gibt es auch bedeutende Unterschiede in physiologischen Eigenschaften, der Pathogenese von Krankheiten und Charakteristika im Lebensverlauf (Beginn und Dauer der Geschlechtsreife, Anzahl der Nachkommen) [151]. Im Hinblick auf die Mechanismen des Alterns wurden mehrere Unterschiede zwischen Maus und Mensch festgestellt. So konnte gezeigt werden, dass Nagetiere, die eine deutlich kürzere Lebenserwartung haben, ähnlich dem Menschen eine einzelne mtDNA-Mutation mit geringer Heteroplasmie in einer Zelle akkumulieren [152]. Am Menschen wurde die Theorie des sogenannten „random drift“ als Erklärung für diese klonale Expansion von mtDNA-Mutationen

etabliert, jedoch wurde in Rechenmodellen gezeigt, dass diese Theorie für Nagetiere nicht ausreichend ist [153]. Desweiteren wurde beobachtet, dass Punkt-Mutationen beim Menschen mit dem Alter zunehmen, was bei Mäusen nicht der Fall ist [141]. Auch zeigen beide Spezies Unterschiede im Ausmaß der mtDNA-Deletionen in verschiedenen Organsystemen. So ist beispielsweise die Leber in der Maus eines der am schwersten betroffenen Organe, während die menschliche Leber im Vergleich zu anderen Organen nur geringgradig betroffen ist [141].

Aufgrund dessen ist unklar, inwieweit beim Zusammenhang zwischen Veränderungen der mtDNA und dem Alterungsprozess Ergebnisse aus Mausstudien auf den Menschen übertragen werden können [141]. Mehrere Publikationen warnen davor, die Rolle von mtDNA-Mutationen im murinen Alterungs- und Neurodegenerationsprozess zu überschätzen [140].

5.3. Unterschiede zwischen den einzelnen anatomischen Regionen

In unserer Untersuchung war auffällig, dass im Homogenat und der Substantia nigra die Deletionsgrade höher als im Hippocampus waren. Desweiteren zeigte sich, dass der unter Punkt 5.2.2. diskutierte Anstieg der mtDNA-Kopienzahl im Alterungsprozess in Homogenat und der Substantia nigra gefunden wurde, im Hippocampus jedoch keine Korrelation zwischen Alter und mtDNA-Kopienzahl nachweisbar war.

Es ist bekannt, dass bestimmte Zelltypen besonders anfällig für Neurodegeneration sind [16]. Dabei stehen vor allem die dopaminergen Neurone im Vordergrund sowie mit Einschränkungen die serotonergen Neurone, während histaminerge und cholinerge Neurone relativ resistent sind [90]. Unter Punkt 1.1.5. wurde bereits angedeutet, dass auch Dopamin selbst für die besondere Vulnerabilität dopaminergener Neurone verantwortlich sein könnte [154], unter anderem durch eine spezifische Interaktion mit Parkinson-assoziierten Genen [155]. Es konnte gezeigt werden, dass Dopamin die Löslichkeit von Parkin vermindert und seine enzymatische Aktivität herabsetzt [156]. Ein weiteres Argument für eine selektive Empfindlichkeit der dopaminergen Neurone ist deren hohe kontinuierliche Kalzium-Konzentration, die bereits in der Einleitung unter Punkt 1.1.5. beschrieben wurde. Desweiteren können Defekte von Transkriptionsfaktoren, die im Rahmen der Neurogenese spezifisch die Differenzierung dopaminergener Neurone regulieren, bereits in einer unzureichenden Entwicklung der Substantia nigra resultieren und die Entwicklung eines Parkinson-Syndroms begünstigen [157]. Auch wurden mehrere Gene gefunden, die in der A9-Region, die im Morbus Parkinson bevorzugt degeneriert, vermehrt gegenüber anderen dopaminergen Arealen exprimiert werden [158].

Beim Menschen sind beide anatomischen Regionen, die in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zum Hippocampus Auffälligkeiten zeigten, im Krankheitsbild des Morbus Parkinson bedeutend. Der Untergang der Substantia nigra ist das neuropathologische Charakteristikum der Erkrankung und die Ursache der Bewegungsstörungen, die beim Morbus Parkinson im Vordergrund stehen. Auch die Neurodegeneration der dopaminergen Zellen im Bulbus olfactorius ist klinisch relevant und

manifestiert sich in Geruchsstörungen, die ein Frühzeichen der Erkrankung darstellen können [159]. Aufgrund dessen ist es gut nachvollziehbar, dass hier in dopaminergen Neuronen ein erhöhter Deletionsgrad vorzufinden ist. Ebenso leuchtet es ein, dass sie aufgrund der übermäßigen Exposition gegen Noxen mit einer Hochregulation der mtDNA-Kopienzahl reagieren. Wie bereits in Kap. 5.2.2. dargelegt, sind die bisherigen Ergebnisse zu Änderungen der mtDNA-Kopienzahl im Alterungsprozess bei Mäusen uneinheitlich. Ein Erklärungsansatz dafür ist, dass jeweils nur Homogenate von Hirnen untersucht wurden, während möglicherweise die einzelnen Regionen des ZNS unterschiedliche Charakteristika in der Regulation der mtDNA-Kopienzahl zeigen [141]. Es wurde lediglich eine Studie gefunden, in der einzelne Hirnregionen analysiert wurden, hierbei zeigte sich in einem transgenen Mausmodell ein regionspezifisch unterschiedliches Verhalten zwischen den durch die dort untersuchte Erkrankung betroffenen pontinen Kernen und dem nicht betroffenen Hippocampus [147]. Untersuchungen, die explizit die Substantia nigra und den olfaktorischen Bulbus zum Ziel hatten, konnten in intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden. Jedoch wurde in einem Knockout-Modell auf molekularer Grundlage beobachtet, dass die Hochregulation von PARIS regionspezifisch unterschiedlich ausfällt [78], was auf verschiedene Mechanismen der Regulation der mtDNA-Kopienzahl schließen lässt. Zusammengefasst erscheinen also die in dieser Arbeit erhobenen Befunde gut nachvollziehbar, die bisherige Datenlage ist jedoch zur endgültigen Einordnung der Ergebnisse nicht ausreichend.

Auch bezüglich der Deletionen konnten keine Studien gefunden werden, die vergleichend mehrere Regionen des ZNS in Mäusen beschreiben. Allerdings gibt es hierzu Ergebnisse von Untersuchungen an Menschen. In einer Analyse von bis zu 12 Regionen des ZNS von 6 gesunden Menschen zeigte sich, dass vor allem die dopaminergen Regionen wie die Substantia nigra von Deletionen betroffen sind, während der Hippocampus nur eine durchschnittliche Deletionslast aufweist [160]. Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Untersuchung an 10 menschlichen ZNS-Proben bestätigt [38]. Also kann diesbezüglich konstatiert werden, dass die Erhöhung des Deletionsgrades in Bulbus olfactorius und Substantia nigra gegenüber dem Hippocampus plausibel erscheinen und auch durch analoge Befunde in menschlichen Gewebeproben untermauert werden.

Jedoch wird hierdurch die Erhöhung des Deletionsgrades des Bulbus olfactorius gegenüber der Substantia nigra nicht erklärt. Diese könnte daran liegen, dass der Bulbus olfactorius auf Homogenats-Ebene untersucht wurde, während in der Substantia nigra einzelne Zellsomata analysiert wurden. Folglich müsste es im Homogenat Gewebe mit gegenüber den Zellsomata erhöhter Deletionslast geben. Dabei könnte es sich um die Axon-Terminalen handeln. Die dopaminergen Neurone des Bulbus olfactorius haben kurze Projektionen, die überwiegend innerhalb des Bulbus enden [146]. Die Axone spielen möglicherweise insbesondere zu Beginn der Neurodegeneration im Alterungsprozess und beim Morbus Parkinson eine bedeutende Rolle und sind frühzeitig vom Untergang betroffen [161]. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass in nicht-

neuronalen Zellen wie Astrozyten mtDNA-Deletionen ähnlich häufig wie in Neuronen anfallen [162]. In bisherigen Untersuchungen waren die Deletionsgrade der Substantia nigra höher als im Bulbus olfactorius [143, 144, 160]. Dass dies in unseren Untersuchungen nicht so war, könnte zum einen daran liegen, dass hier auch verschiedene Gewebearten (Homogenat versus Zellsomata) untersucht wurden und das Homogenat Gewebe mit höherer Deletionslast als Zellsomata wie beispielsweise Axon-Terminalen enthält. Analoge Arbeiten, die Homogenat und Zellsomata miteinander verglichen, konnten in intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden. Zum anderen könnte es daran liegen, dass in unserer Arbeit relativ junge Tiere untersucht wurden. Für den Morbus Parkinson wurde eine Stadien-Einteilung postuliert, die besagt, dass der olfaktorische Kortex vor der Substantia nigra von Neurodegeneration betroffen ist [15]. Möglicherweise waren die von uns untersuchten Tiere noch in einem Stadium mit überwiegender Degeneration des Bulbus olfactorius und noch zu jung, um die von anderen Autoren berichtete erhöhte Deletionslast in der Substantia nigra zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit mit einer Prävalenz von etwa 1-5 %. Verschiedene Faktoren, unter anderem die genetische Prädisposition, begünstigen die Krankheitsentstehung. Von besonderem Interesse ist daher die Erforschung der Gene der bisher identifizierten familiären Parkinson-Syndrome, für die eine ätiologische Verwandtschaft zum idiopathischen Parkinson-Syndrom angenommen wird. Eines dieser Gene ist das PARK2-Gen, das das Protein Parkin kodiert. Parkin ist über mehrere Mechanismen mit dem mitochondrialen Metabolismus assoziiert, der ein wichtiger Faktor in der Entstehung des Morbus Parkinson sein könnte. Insbesondere Veränderungen der mtDNA wird hierbei eine bedeutende Rolle zugeordnet.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie verschiedene Parkin-Expressionsmuster mtDNA-Deletionsgrad, mtDNA-Kopienzahl und mitochondriale Biogenese beeinflussen. Dazu wurden mittels quantitativer realtime-PCR der Deletionsgrad und die mtDNA-Kopienzahl bestimmt und mittels Western Blot die Mitochondrienmenge semiquantitativ gemessen. Die Proben stammten von 2, 9 und 12 Monate alten Mäusen mit verschiedenen Parkin-Expressionsmustern (Wildtyp, Wildtyp mit zusätzlicher Expression von humanem Parkin, Knockout, human-pathogene Mutation). Das Gewebe stammte einerseits von Homogenat des Bulbus olfactorius, desweiteren wurden mittels Lasermikrodissektion Einzelzellen aus der Substantia nigra und dem Hippocampus gewonnen.

Es zeigte sich eine Tendenz zu einer vermehrten mitochondrialen Biogenese bei jungen Knockout-Tieren. Bei zusätzlicher Expression von humanem Parkin zeigte sich im Alter eine vermehrte Akkumulation von mtDNA-Deletionen. Eine human-pathogene Stop-Mutation hatte hingegen keinen signifikanten Effekt. Nebenbefundlich zeigte sich im Alter ein Anstieg der mtDNA-Kopienzahl sowie ein Abfall der Deletionsgrade. Die Deletionsgrade waren im Bulbus olfactorius und der Substantia nigra höher als im Hippocampus.

Die vermehrte mitochondriale Biogenese bei jungen Tieren mit Parkin-Knockout könnte als Kompensationsmechanismus gegen die genetische Manipulation erklärt werden. Dass der Effekt bei älteren Tieren nicht mehr nachgewiesen werden kann, könnte an einem Versagen des Kompensationsmechanismus im Alter liegen.

Die Zunahme der Deletionen bei Tieren mit zusätzlicher Expression von humanem Parkin könnte auf eine toxische Wirkung speziefremden Parkins hindeuten. In der bisherigen Literatur findet sich überwiegend eine protektive Wirkung der Überexpression, hierbei wurde jedoch nur in einem Fall der Einfluss auf die mtDNA untersucht und es wurde immer die Parkin-Form der untersuchten Spezies überexprimiert. In einer neuen Untersuchung von 2014 konnte eine schädliche Wirkung von humanem Parkin auf Ratten und Mäuse beobachtet werden.

Die human-pathogene Stop-Mutation hatte keinen Effekt auf die untersuchten Parameter, was als Hinweis auf einen vorhandenen Kompensationsmechanismus verstanden werden kann. Dieser unterscheidet sich offensichtlich von dem in Knockout-Tieren vorhandenen Kompensationsmechanismus, der über eine Änderung der untersuchten Parameter wirkt. Die

bisher in der Literatur beschriebenen Parkin-Mutationen unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften, so dass auch unterschiedliche Kompensationsmechanismen denkbar sind.

Insgesamt hätten sich möglicherweise noch deutlichere Befunde ergeben, wenn beispielsweise zusätzliche genetische Manipulationen erfolgt wären oder die Tiere einem Umweltstressor ausgesetzt worden wären. Auch wäre eine Untersuchung einer größeren Anzahl an Tieren wünschenswert gewesen, um statistische Schwankungen und Messungenauigkeiten besser ausgleichen zu können.

Nebenbefundlich zeigte sich im Alterungsprozess ein Abfall der Deletionsgrade. Dies kann durch Reparatur- bzw. Qualitätskontrollmechanismen, die defekte Mitochondrien bevorzugt eliminieren, erklärt werden, steht jedoch teils im Widerspruch zu vorangegangenen Untersuchungen. In mehreren Studien zeigte sich eher eine Zunahme der Deletionsgrade im Alterungsprozess. Bei heterogener Datenlage wären weitere Studien mit Untersuchung verschiedener Hirnregionen zur Klärung des Widerspruchs wünschenswert. Dagegen steht die Zunahme der mtDNA-Kopienzahl im Alter in Übereinstimmung mit vorherigen Studien und kann als Kompensationsmechanismus gegen den im Alter erhöhten oxidativen Stress verstanden werden.

Im Vergleich der verschiedenen anatomischen Regionen zeigte sich ein erhöhter Deletionsgrad der dopaminergen Neurone in Substantia nigra und Bulbus olfactorius sowie eine Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl gegenüber dem Hippocampus. Die selektive Vulnerabilität dopaminergener Neurone in der Neurodegeneration ist bereits beschrieben worden und kann teilweise dem Dopamin selbst zugeschrieben werden. Der Morbus Parkinson ist charakterisiert durch den Untergang der Neurone in der Substantia nigra und eine Geruchsstörung, die durch Degeneration dopaminergener Neurone im Bulbus olfactorius verursacht wird, stellt ein häufiges Frühzeichen der Erkrankung dar. Vor diesem Hintergrund ist es gut nachvollziehbar, dass insbesondere diese Regionen von erhöhten Deletionsgraden der mtDNA betroffen sind und entsprechend die mitochondriale Biogenese hochregulieren. Die im Bulbus olfactorius beobachtete Erhöhung des Deletionsgrades gegenüber der Substantia nigra könnte daran liegen, dass hier nicht nur Zellsomata, sondern auch alle anderen Gewebebestandteile wie Axon-Terminalen untersucht wurden, in denen möglicherweise eine erhöhte Deletionslast vorliegt.

Zusammengefasst waren die festgestellten Veränderungen von Deletionsgraden, mtDNA-Kopienzahl und mitochondrialen Proteinmengen bei den verschiedenen untersuchten Parkin-Mausmodellen eher gering. Es ergaben sich Hinweise auf Kompensationsmechanismen und altersassoziierte Veränderungen. Aufgrund der geringen Tieranzahl in den untersuchten Subgruppen (mehrere Altersstufen, mehrere Genotypen) können aufgrund der vorliegenden Daten jedoch leider keine weitreichenden Schlüsse für die Bedeutung von mtDNA-Deletionen bei Parkin-assoziierten Erkrankungen gezogen werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| ACTB | Actin- β |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| COMT | Catechol-O-Methyltransferase |
| COX3 | Cyclooxygenase 3 |
| CytB | Cytochrom B |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer |
| kb | Kilobasenpaare |
| LHON | Lebersche hereditäre Optikusneuropathie |
| MAO-B | Monoaminoxidase-B |
| Mb | Megabasenpaare |
| MELAS | Mitochondriale Enzephalopathie, Laktat-Azidose, Stroke-ähnliche Episoden |
| MPTP | 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin |
| mRNA | messenger RNA |
| mtDNA | mitochondriale DNA |
| ND1 | Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase 1 |
| PBS(-T) | Phosphat-gepufferte Salzlösung (mit Tween) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| Taq | Thermophilus aquaticus |
| TH | Tyrosin-Hydroxylase |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| UPS | Ubiquitin-Proteasom-System |
| VDAC | Voltage-dependent Anion-channel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

8. Literaturverzeichnis

1. Chin-Chan, M., J. Navarro-Yepes, and B. Quintanilla-Vega, *Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 124.
2. von Campenhausen, S., et al., *Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe*. Eur Neuropsychopharmacol, 2005. **15**(4): p. 473-90.
3. Lees, A.J., J. Hardy, and T. Revesz, *Parkinson's disease*. Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2055-66.
4. Perier, C. and M. Vila, *Mitochondrial biology and Parkinson's disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a009332.
5. Diener, H.-C.W., Christian, *Parkinson-Syndrome - Diagnostik und Therapie*. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2012.
6. Quik, M., X.A. Perez, and T. Bordia, *Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease*. Mov Disord, 2012. **27**(8): p. 947-57.
7. Obeso, J.A., et al., *The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations*. Ann Neurol, 2008. **64 Suppl 2**: p. S30-46.
8. Albin, R.L., A.B. Young, and J.B. Penney, *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. Trends Neurosci, 1989. **12**(10): p. 366-75.
9. Ossig, C. and H. Reichmann, *Treatment of Parkinson's disease in the advanced stage*. J Neural Transm, 2013. **120**(4): p. 523-9.
10. Grandas, F., *Subcutaneous infusions of apomorphine: a reappraisal of its therapeutic efficacy in advanced Parkinson's disease*. Expert Rev Neurother, 2013. **13**(12): p. 1343-53.
11. Fasano, A., A. Daniele, and A. Albanese, *Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation*. Lancet Neurol, 2012. **11**(5): p. 429-42.
12. Dickson, D.W., *Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
13. Greffard, S., et al., *Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra*. Arch Neurol, 2006. **63**(4): p. 584-8.
14. Lang, A.E. and A.M. Lozano, *Parkinson's disease. First of two parts*. N Engl J Med, 1998. **339**(15): p. 1044-53.
15. Braak, H., et al., *Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 121-34.
16. Braak, H., et al., *Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered*. Mov Disord, 2006. **21**(12): p. 2042-51.
17. Damier, P., et al., *The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease*. Brain, 1999. **122 (Pt 8)**: p. 1437-48.
18. Wirdefeldt, K., et al., *Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence*. Eur J Epidemiol, 2011. **26 Suppl 1**: p. S1-58.
19. Priyadarshi, A., et al., *Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis*. Environ Res, 2001. **86**(2): p. 122-7.
20. Singleton, A.B., M.J. Farrer, and V. Bonifati, *The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications*. Mov Disord, 2013. **28**(1): p. 14-23.
21. Lai, H.J., C.H. Lin, and R.M. Wu, *Early-onset autosomal-recessive parkinsonian-pyramidal syndrome*. Acta Neurol Taiwan, 2012. **21**(3): p. 99-107.
22. Simon-Sanchez, J., et al., *Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease*. Nat Genet, 2009. **41**(12): p. 1308-12.
23. Chaturvedi, R.K. and M. Flint Beal, *Mitochondrial diseases of the brain*. Free Radic Biol Med, 2013. **63**: p. 1-29.
24. Sulzer, D., *Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease*. Trends Neurosci, 2007. **30**(5): p. 244-50.
25. Kumar, H., et al., *The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(8): p. 10478-504.
26. Moore, D.J., et al., *Molecular pathophysiology of Parkinson's disease*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 57-87.

27. Ambrosi, G., S. Cerri, and F. Blandini, *A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease*. J Neural Transm, 2014. **121**(8): p. 849-59.
28. Chan, C.S., et al., *'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1081-6.
29. Guzman, J.N., et al., *Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1*. Nature, 2010. **468**(7324): p. 696-700.
30. Sanchez-Guajardo, V., et al., *Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to alpha-synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity*. ASN Neuro, 2013. **5**(2): p. 113-39.
31. Chinta, S.J., et al., *Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease?* J Intern Med, 2013. **273**(5): p. 429-36.
32. Prusiner, S.B., et al., *Evidence for alpha-synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(38): p. E5308-17.
33. Gaweda-Walerych, K. and C. Zekanowski, *Integrated pathways of parkin control over mitochondrial maintenance - relevance to Parkinson's disease pathogenesis*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2013. **73**(2): p. 199-224.
34. Greaves, L.C., et al., *Mitochondrial DNA and disease*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 274-86.
35. Gredilla, R., *DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging*. J Aging Res, 2010. **2011**: p. 257093.
36. Schon, E.A., S. DiMauro, and M. Hirano, *Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(12): p. 878-90.
37. Gu, G., et al., *Mitochondrial DNA deletions/rearrangements in parkinson disease and related neurodegenerative disorders*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(7): p. 634-9.
38. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 515-7.
39. Kraytsberg, Y., et al., *Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 518-20.
40. Swerdlow, R.H., et al., *Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 1996. **40**(4): p. 663-71.
41. Ekstrand, M.I., et al., *Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1325-30.
42. Luoma, P., et al., *Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study*. Lancet, 2004. **364**(9437): p. 875-82.
43. Frahm, T., et al., *Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(11): p. 1192-200.
44. Cavelier, L., et al., *Decreased cytochrome-c oxidase activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics*. Genomics, 1995. **29**(1): p. 217-24.
45. Berdanier, C.D. and H.B. Everts, *Mitochondrial DNA in aging and degenerative disease*. Mutat Res, 2001. **475**(1-2): p. 169-83.
46. Scarpulla, R.C., *Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1147**: p. 321-34.
47. Suomalainen, A. and P. Isohanni, *Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms*. Neuromuscul Disord, 2010. **20**(7): p. 429-37.
48. Longley, M.J., et al., *Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12244-8.
49. Hudson, G., et al., *Mutation of the linker region of the polymerase gamma-1 (POLG1) gene associated with progressive external ophthalmoplegia and Parkinsonism*. Arch Neurol, 2007. **64**(4): p. 553-7.
50. Borland, M.K., et al., *Relationships among molecular genetic and respiratory properties of Parkinson's disease cybrid cells show similarities to Parkinson's brain tissues*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(1): p. 68-74.
51. Dawson, T.M., H.S. Ko, and V.L. Dawson, *Genetic animal models of Parkinson's disease*. Neuron, 2010. **66**(5): p. 646-61.

52. Narendra, D., et al., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. J Cell Biol, 2008. **183**(5): p. 795-803.
53. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
54. Dawson, T.M. and V.L. Dawson, *The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease*. Mov Disord, 2010. **25 Suppl 1**: p. S32-9.
55. Park, J., et al., *Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1157-61.
56. Clark, I.E., et al., *Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1162-6.
57. Narendra, D.P., et al., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin*. PLoS Biol, 2010. **8**(1): p. e1000298.
58. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
59. Nuytemans, K., et al., *Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update*. Hum Mutat, 2010. **31**(7): p. 763-80.
60. Kay, D.M., et al., *Heterozygous parkin point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients*. Ann Neurol, 2007. **61**(1): p. 47-54.
61. Clark, L.N., et al., *Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson disease*. Arch Neurol, 2006. **63**(4): p. 548-52.
62. Sriram, S.R., et al., *Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(17): p. 2571-86.
63. Henn, I.H., et al., *Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms*. J Neurochem, 2005. **92**(1): p. 114-22.
64. Wong, E.S., et al., *Relative sensitivity of parkin and other cysteine-containing enzymes to stress-induced solubility alterations*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 12310-8.
65. Mori, H., et al., *Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q*. Neurology, 1998. **51**(3): p. 890-2.
66. Pouloupoulos, M., O.A. Levy, and R.N. Alcalay, *The neuropathology of genetic Parkinson's disease*. Mov Disord, 2012. **27**(7): p. 831-42.
67. Farrer, M., et al., *Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations*. Ann Neurol, 2001. **50**(3): p. 293-300.
68. Sasaki, S., et al., *Parkin-positive autosomal recessive juvenile Parkinsonism with alpha-synuclein-positive inclusions*. Neurology, 2004. **63**(4): p. 678-82.
69. Adel, S., et al., *Co-occurrence of restless legs syndrome and Parkin mutations in two families*. Mov Disord, 2006. **21**(2): p. 258-63.
70. Deng, H., et al., *A family with Parkinson disease, essential tremor, bell palsy, and parkin mutations*. Arch Neurol, 2007. **64**(3): p. 421-4.
71. Gegg, M.E., et al., *Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(24): p. 4861-70.
72. Wang, H., et al., *Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11649-58.
73. Tanaka, A., *Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network*. FEBS Lett, 2010. **584**(7): p. 1386-92.
74. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 433-46.
75. Dagda, R.K. and C.T. Chu, *Mitochondrial quality control: insights on how Parkinson's disease related genes PINK1, parkin, and Omi/HtrA2 interact to maintain mitochondrial homeostasis*. J Bioenerg Biomembr, 2009. **41**(6): p. 473-9.
76. Rothfuss, O., et al., *Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(20): p. 3832-50.
77. Kuroda, Y., et al., *Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(6): p. 883-95.

78. Shin, J.H., et al., *PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease*. Cell, 2011. **144**(5): p. 689-702.
79. Zheng, B., et al., *PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease*. Sci Transl Med, 2010. **2**(52): p. 52ra73.
80. Van Rompuy, A.S., et al., *Long-term overexpression of human wild-type and T240R mutant Parkin in rat substantia nigra induces progressive dopaminergic neurodegeneration*. J Neuropathol Exp Neurol, 2014. **73**(2): p. 159-74.
81. Itier, J.M., et al., *Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(18): p. 2277-91.
82. Von Coelln, R., et al., *Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10744-9.
83. Palacino, J.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18614-22.
84. Kitada, T., et al., *Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice*. J Neurochem, 2009. **111**(3): p. 696-702.
85. Lu, X.H., et al., *Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein*. J Neurosci, 2009. **29**(7): p. 1962-76.
86. Bian, M., et al., *Overexpression of parkin ameliorates dopaminergic neurodegeneration induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39953.
87. Greene, J.C., et al., *Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4078-83.
88. Pesah, Y., et al., *Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress*. Development, 2004. **131**(9): p. 2183-94.
89. Whitworth, A.J., et al., *Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(22): p. 8024-9.
90. Sang, T.K., et al., *A Drosophila model of mutant human parkin-induced toxicity demonstrates selective loss of dopaminergic neurons and dependence on cellular dopamine*. J Neurosci, 2007. **27**(5): p. 981-92.
91. Wang, C., et al., *Drosophila overexpressing parkin R275W mutant exhibits dopaminergic neuron degeneration and mitochondrial abnormalities*. J Neurosci, 2007. **27**(32): p. 8563-70.
92. Rana, A., M. Rera, and D.W. Walker, *Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8638-43.
93. Paxinos, G., et al., *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Vol. 3. 2008.
94. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2012. **4**.
95. Lavoie, B., Y. Smith, and A. Parent, *Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry*. J Comp Neurol, 1989. **289**(1): p. 36-52.
96. Graham, R.C., Jr. and M.J. Karnovsky, *The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique*. J Histochem Cytochem, 1966. **14**(4): p. 291-302.
97. Emmert-Buck, M.R., et al., *Laser capture microdissection*. Science, 1996. **274**(5289): p. 998-1001.
98. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
99. Ahmad, A.I. and J.B. Ghasemi, *New FRET primers for quantitative real-time PCR*. Anal Bioanal Chem, 2007. **387**(8): p. 2737-43.
100. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
101. Perier, C., et al., *Accumulation of mitochondrial DNA deletions within dopaminergic neurons triggers neuroprotective mechanisms*. Brain, 2013. **136**(Pt 8): p. 2369-78.

102. Krishnan, K.J., et al., *A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells*. Anal Biochem, 2007. **370**(1): p. 127-9.
103. He, L., et al., *Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. e68.
104. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
105. Praßler, C., *Mitochondriale Funktionsstörungen in einem Parkinson-Zellkulturmodell mit α -Synuclein-Überexpression*. 2015.
106. Li, R. and Y. Shen, *An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research*. Life Sci, 2013. **92**(13): p. 747-51.
107. Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **28**(5): p. 815-20.
108. Granger-Schnarr, M., et al., *Specific protein-DNA complexes: immunodetection of the protein component after gel electrophoresis and Western blotting*. Anal Biochem, 1988. **174**(1): p. 235-8.
109. De Blas, A.L. and H.M. Cherwinski, *Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies*. Anal Biochem, 1983. **133**(1): p. 214-9.
110. Medberry, S., S. Gallagher, and B. Moomaw, *Overview of digital electrophoresis analysis*. Curr Protoc Mol Biol, 2004. **Chapter 10**: p. Unit 10 5.
111. Kaufmann, S.H., C.M. Ewing, and J.H. Shaper, *The erasable Western blot*. Anal Biochem, 1987. **161**(1): p. 89-95.
112. Messina, A., et al., *VDAC isoforms in mammals*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(6): p. 1466-76.
113. Lee, Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(10).
114. Andres-Mateos, E., et al., *DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(37): p. 14807-12.
115. Giordano, C., et al., *Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy*. Brain, 2014. **137**(Pt 2): p. 335-53.
116. Wang, Y.C., et al., *Mitochondrial DNA copy number correlates with oxidative stress and predicts mortality in nondiabetic hemodialysis patients*. J Nephrol, 2011. **24**(3): p. 351-8.
117. Al-Kafaji, G. and J. Golbahar, *High glucose-induced oxidative stress increases the copy number of mitochondrial DNA in human mesangial cells*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 754946.
118. Tanaka, A., et al., *The overexpression of Twinkle helicase ameliorates the progression of cardiac fibrosis and heart failure in pressure overload model in mice*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67642.
119. Hernandez-Rios, R., et al., *Low fructose and low salt diets increase mitochondrial DNA in white blood cells of overweight subjects*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2013. **121**(9): p. 535-8.
120. Suen, D.F., et al., *Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic hybrid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11835-40.
121. Hindle, J.V., *Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease*. Age Ageing, 2010. **39**(2): p. 156-61.
122. Rodriguez-Navarro, J.A., et al., *Mortality, oxidative stress and tau accumulation during ageing in parkin null mice*. J Neurochem, 2007. **103**(1): p. 98-114.
123. Kyratzi, E., et al., *Differential effects of Parkin and its mutants on protein aggregation, the ubiquitin-proteasome system, and neuronal cell death in human neuroblastoma cells*. J Neurochem, 2007. **102**(4): p. 1292-303.
124. Ardley, H.C., et al., *Inhibition of proteasomal activity causes inclusion formation in neuronal and non-neuronal cells overexpressing Parkin*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(11): p. 4541-56.
125. Schon, E.A. and S. Przedborski, *Mitochondria: the next (neurode)generation*. Neuron, 2011. **70**(6): p. 1033-53.
126. Rawal, N., et al., *Parkin protects dopaminergic neurons from excessive Wnt/beta-catenin signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(3): p. 473-8.

127. Grigoryan, T., et al., *Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice*. *Genes Dev*, 2008. **22**(17): p. 2308-41.
128. Phillips, N.R., M.L. Sprouse, and R.K. Roby, *Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: a multiplex real-time PCR assay*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 3887.
129. Song, L., et al., *Mutant Twinkle increases dopaminergic neurodegeneration, mtDNA deletions and modulates Parkin expression*. *Hum Mol Genet*, 2012. **21**(23): p. 5147-58.
130. Staropoli, J.F., et al., *Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity*. *Neuron*, 2003. **37**(5): p. 735-49.
131. Higashi, Y., et al., *Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death*. *J Neurochem*, 2004. **89**(6): p. 1490-7.
132. Haque, M.E., et al., *Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(5): p. 1716-21.
133. Kim, R.H., et al., *Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(14): p. 5215-20.
134. Song, D.D., et al., *Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP*. *Exp Neurol*, 2004. **186**(2): p. 158-72.
135. Dutta, S. and P. Sengupta, *Men and mice: Relating their ages*. *Life Sci*, 2015.
136. Zeng, Z., et al., *Mitochondrial DNA deletions are associated with ischemia and aging in Balb/c mouse brain*. *J Cell Biochem*, 1999. **73**(4): p. 545-53.
137. Tanhauser, S.M. and P.J. Laipis, *Multiple deletions are detectable in mitochondrial DNA of aging mice*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(42): p. 24769-75.
138. Melov, S., et al., *Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(5): p. 974-82.
139. Brossas, J.Y., et al., *Multiple deletions in mitochondrial DNA are present in senescent mouse brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **202**(2): p. 654-9.
140. Guo, X., et al., *Mitochondrial DNA deletions in mice in men: substantia nigra is much less affected in the mouse*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1797**(6-7): p. 1159-62.
141. Kazachkova, N., et al., *Mitochondrial DNA damage patterns and aging: revising the evidences for humans and mice*. *Aging Dis*, 2013. **4**(6): p. 337-50.
142. Cortopassi, G.A., et al., *A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(16): p. 7370-4.
143. Corral-Debrinski, M., et al., *Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age*. *Nat Genet*, 1992. **2**(4): p. 324-9.
144. Meissner, C., et al., *The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more?* *Exp Gerontol*, 2008. **43**(7): p. 645-52.
145. Arthur, C.R., et al., *Parkinson's disease brain mitochondria have impaired respirasome assembly, age-related increases in distribution of oxidative damage to mtDNA and no differences in heteroplasmic mtDNA mutation abundance*. *Mol Neurodegener*, 2009. **4**: p. 37.
146. Cave, J.W. and H. Baker, *Dopamine systems in the forebrain*. *Adv Exp Med Biol*, 2009. **651**: p. 15-35.
147. Kazachkova, N., et al., *Patterns of mitochondrial DNA damage in blood and brain tissues of a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease*. *Neurodegener Dis*, 2013. **11**(4): p. 206-14.
148. Gadaleta, M.N., et al., *Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats*. *Mutat Res*, 1992. **275**(3-6): p. 181-93.
149. Barazzoni, R., K.R. Short, and K.S. Nair, *Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3343-7.
150. Michalak, A., J. Krzeszowiak, and I. Markiewicz-Gorka, *[The correlations between aging of the human body, oxidative stress and reduced efficiency of repair systems]*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2014. **68**: p. 1483-91.

151. Demetrius, L., *Aging in mouse and human systems: a comparative study*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1067**: p. 66-82.
152. Cao, Z., et al., *Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(21): p. 4502-8.
153. Kowald, A. and T.B. Kirkwood, *Mitochondrial mutations and aging: random drift is insufficient to explain the accumulation of mitochondrial deletion mutants in short-lived animals*. Aging Cell, 2013. **12**(4): p. 728-31.
154. Cookson, M.R., *The biochemistry of Parkinson's disease*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 29-52.
155. Wang, C., et al., *Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(24): p. 3885-97.
156. LaVoie, M.J., et al., *Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1214-21.
157. Barzilai, A. and E. Melamed, *Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease*. Trends Mol Med, 2003. **9**(3): p. 126-32.
158. Chung, C.Y., et al., *Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(13): p. 1709-25.
159. Langston, J.W., *The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg*. Ann Neurol, 2006. **59**(4): p. 591-6.
160. Soong, N.W., et al., *Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain*. Nat Genet, 1992. **2**(4): p. 318-23.
161. Rodriguez, M., et al., *Parkinson's disease as a result of aging*. Aging Cell, 2015. **14**(3): p. 293-308.
162. Storm, T., et al., *Mitotic brain cells are just as prone to mitochondrial deletions as neurons: a large-scale single-cell PCR study of the human caudate nucleus*. Exp Gerontol, 2002. **37**(12): p. 1389-400.

9. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Bender danke ich für die Möglichkeit, wertvolle wissenschaftliche Erfahrungen in seiner Arbeitsgruppe sammeln zu können, sowie für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Labors danke ich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Frau Dr. Anne Averdam und Herrn Dr. Christoph Laub für ihre wertvollen Hilfestellungen im Laboralltag.

Frau Prof. Dr. Konstanze Winklhofer danke ich für die Überlassung der Gewebeproben zur Untersuchung.

Herrn Prof. Dr. Thomas Klopstock und allen Mitarbeitern des Friedrich-Baur-Instituts sowie Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und technischem Gerät.

Ich danke Herrn Dr. Christoph Praßler für die konstruktive und kurzweilige Zusammenarbeit im Labor und außerhalb desselbigen. Die tiefgründigen Konversationen mit ihm sind eine große Bereicherung für mich.

Ganz besonders danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung.

11. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Hauer, Johannes

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Mitochondriale Dysfunktion bei Parkin-Mausmodellen des Morbus Parkinson

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift