

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

Vorstand: Prof. Dr. Marianne Dieterich

**Molekulare Mechanismen der
altersassozierten vestibulären
Dysfunktion**

Dissertation

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

vorgelegt von

Amelie Christina Zimmermann
aus Ulm

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Matthias Elstner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Friedrich Ihler Prof. Dr. med. Cornella Kornblum
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. phil. Sonja Brosel
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	15.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Zusammenfassung	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Schwindel im Alter	1
1.2 Das vestibuläre System.....	2
1.2.1 Das periphere vestibuläre System	2
1.2.2 Das zentrale vestibuläre System	4
1.3 Alterungsprozesse im vestibulären System.....	4
1.4 Molekulare Mechanismen des Alterns – Erkenntnisse aus dem auditorischen System	5
1.4.1 Oxidativer Stress	6
1.4.2 Mitochondrien und Apoptose	7
1.5 Regulation der mitochondrialen Biogenese	10
1.6 Pharmakologische Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese	13
1.6.1 AICAR.....	13
1.6.2 Bezafibrat	14
1.7 Mausmodell „mtDNA-mutator“-Maus.....	14
1.8 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	16
1.8.1 Phänotypisierung der „mtDNA-mutator“-Mäuse.....	16
1.8.2 Deletionsbestimmung im Felsenbein der „mtDNA-mutator“- Mäuse.....	17
2 Zielsetzung und Fragestellung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Molekulare Veränderungen in der „mtDNA-mutator“-Maus.....	21

3.1.1	Mausstudien	21
3.1.2	Versuchstiere.....	21
3.1.3	Herstellung der Paraffinschnitte.....	22
3.1.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	22
3.1.5	Nissl-Färbung	23
3.1.6	8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG)-Färbung	23
3.1.7	TUNEL-Assay	25
3.1.8	Immunhistochemische Färbung der Atmungskettenkomplexe	26
3.1.9	Auswertung der histologischen Färbungen.....	28
3.2	Etablierung eines In-vitro-Modells und Testung der pharmakologischen Intervention	30
3.2.1	Präparation der Maus	30
3.2.2	Behandlung der Utrikel	33
3.2.3	Fluoreszenzfärbung	33
3.2.4	LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity-Assay.....	35
3.2.5	RNA-Isolierung	36
3.2.6	Bioanalyser.....	37
3.2.7	Microarray.....	38
3.2.8	RNA-Isolierung mittels des Single Cell-to-CT™ Kits	41
3.2.9	Quantitative Real-Time PCR	42
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Histologische Charakterisierung des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Maus	46
4.1.1	Strukturelle Veränderungen.....	46
4.1.2	Oxidativer Stress	47
4.1.3	Apoptose	48
4.1.4	Auswirkung der Deletionen in der mtDNA auf die Atmungskettenproteine im vestibulären System.....	50
4.1.5	Genexpressionsanalyse im vestibulären System der „mtDNA- mutator“-Mäuse	53

4.2	Etablierung einer Zellkultur und Testung der pharmakologischen Intervention	54
4.2.1	Fluoreszenzfärbung der „Utrikel-Explants“	54
4.2.2	Microarray-basierte Genexpressionsanalyse der „Utrikel-Explants“	57
4.2.3	Validierung der Ergebnisse des Microarrays mittels quantitativer Real-Time PCR.....	66
5	Diskussion.....	68
5.1	Charakterisierung der vestibulären Strukturen der „mtDNA-mutator“-Maus	68
5.1.1	Alterungsphänotyp und Deletionen korrelieren nicht mit vestibulärer Funktion der „mtDNA-mutator“-Maus	68
5.1.2	Verstärkte Apoptose trotz fehlendem oxidativem Stress und strukturellen Veränderungen	70
5.1.3	Kompensationsmechanismen durch Aktivierung regulativer Signalwege	73
5.2	Pharmakologische Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese in „Utrikel-Explants“.....	76
5.2.1	AICAR regt in Utrikeln der Wildtyp-Mäuse die mitochondriale Biogenese sowie proliferative Signalwege an.....	76
5.2.2	Bezafibrat wirkt auf Utrikel über verschiedene Signalwege neuroprotektiv	79
5.2.3	AICAR übt auf „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Maus eine antiapoptotische Wirkung aus	81
5.3	Ausblick.....	84
	Literaturverzeichnis	86
	Anhang.....	100
	Danksagung.....	105
	Eidesstaatliche Versicherung	106

Zusammenfassung

Schwindel und Gleichgewichtsstörungen sind häufige Altersbeschwerden. Bei etwa 60 - 80 % der Patienten wird von einer altersabhängigen Degeneration des vestibulären Systems ausgegangen (Presbyastasis). Histopathologische Studien zeigen entsprechend eine altersabhängige Degeneration von Bestandteilen des vestibulären Systems. Die molekularen Mechanismen sind weitgehend ungeklärt, kausale Therapien existieren nicht. Im auditorischen System des Menschen konnte gezeigt werden, dass Mutationen und Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) mit dem Alter zunehmen und zur mitochondrialen Fehlfunktion führen können.

Mit der sogenannten „mtDNA-mutator“-Maus können altersabhängige molekulare Störungen, insbesondere in Bezug auf die mitochondriale Theorie des Alterns, untersucht werden. An Gewebeschnitten des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Maus wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um die Expression der Atmungskettenenzyme und anderer mitochondrial-assoziiierter Proteine zu untersuchen (z. B. Apoptose und oxidativer Stress). Zudem wurden Teile des vestibulären Systems präpariert und in Kultur genommen. An diesen „Utrikel-Explants“ wurde eine pharmakologische Intervention getestet. Zur Hypothesengenerierung und um neue molekulare Mechanismen aufzudecken, die am Alterungsprozess beteiligt sind, wurde eine Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse durchgeführt. Wichtige Gene wurden durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) validiert.

In den immunhistochemischen Untersuchungen konnten keine Veränderungen der Proteinlevel der Atmungskettenenzyme festgestellt werden. Allerdings konnte eine vermehrte Apoptose im vestibulären System der „mtDNA-mutator“-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden.

Mit der Etablierung der „Utrikel-Explants“ steht ein In-vitro-Modell zur Testung der pharmakologischen Intervention zur Verfügung. Durch die Behandlung mit den Substanzen 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1- β -D-Ribonukleosid (AICAR) und Bezafibrat konnte eine Veränderung der Genexpression von Genen der mitochondrialen Biogenese gezeigt werden. In den Mikroarray-basierten Genexpressionsanalysen fand sich zudem eine Hochregulierung von Signalwegen, die neuroprotektiv und antioxidativ wirken.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Das vestibuläre System.	2
Abbildung 1-2: Ampulle (Crista ampullaris) und Macula.....	3
Abbildung 1-3: Modell zur Entstehung von Altersschwerhörigkeit.....	6
Abbildung 1-4: Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran.	8
Abbildung 1-5: Schwellenwert der mutierten mtDNA (Δ mtDNA).	10
Abbildung 1-6: Mitochondriale Biogenese.....	12
Abbildung 1-7: Äußerer Phänotyp der „mtDNA-mutator“-Maus im Alter von ca. 13 Monaten	15
Abbildung 1-8: Zunahme der Deletionen und der Kopienzahl (Copy number) der mitochondrialen DNA (mtDNA) in der Cochlea und des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Mäuse.....	19
Abbildung 3-1: Präparation des Utrikels.....	32
Abbildung 3-2: Elektropherogramm und „Single Lane Gel-Like Image“ des Bioanalysers	38
Abbildung 3-3: Berechnung der Effizienz anhand einer Standardkurve.....	44
Abbildung 4-1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	46
Abbildung 4-2: Nissl-Färbung.....	47
Abbildung 4-3: 8-OHdG-Färbung	48
Abbildung 4-4: TUNEL-Assay	49
Abbildung 4-5: Anzahl der apoptotischen Zellen.....	49
Abbildung 4-6: Immunhistochemische Färbung der Atmungskettenkomplexe	51
Abbildung 4-7: Dotplot der Quotienten der Intensitätsmessung der Atmungskettenkomplexfärbung Komplex I/Komplex II.	52
Abbildung 4-8: Dotplot der Quotienten der Intensitätsmessung der Atmungskettenkomplexfärbung Komplex IV/Komplex II.	52
Abbildung 4-9: Anfärbung der Zellkerne der explantierten Utrikel mit DAPI...	54
Abbildung 4-10: Phalloidin-Färbung der explantierten Utrikel.	55
Abbildung 4-11: Utrikel gefärbt mit dem LIVE/DEAD®-Assay.....	56

Abbildung 4-12: Messung des prozentualen Rotanteils des LIVE/DEAD®- Assays der Utrikel.	57
Abbildung 4-13: Änderung der Expression der differentiell regulierten Gene durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp- Mäuse mit AICAR	66
Abbildung 4-14: Änderung der Expression der differentiell regulierten Gene durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp- Mäuse mit Bezafibrat	67
Abbildung 5-1: „Platelet-derived growth factor“ (PDGF)-Signalweg.	78
Abbildung 5-2: Wnt/Ca ⁺ -Signalweg.	80
Abbildung 5-3: „Prostate Cancer Signaling“	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Altersverteilung zum Zeitpunkt der Versuche.....	21
Tabelle 3-2:	Chemikalien und Verbrauchsmaterial zur Herstellung der Paraffinschnitte.	22
Tabelle 3-3:	Chemikalien der Nissl-Färbung.	23
Tabelle 3-4:	Protokoll der Nissl-Färbung.....	23
Tabelle 3-5:	Chemikalien der 8-OHdG-Färbung.	24
Tabelle 3-6:	Protokoll der 8-OHdG-Färbung.	24
Tabelle 3-7:	Kit und Chemikalien des TUNEL-Assays.	25
Tabelle 3-8:	Protokoll des TUNEL-Assays.....	26
Tabelle 3-9:	Verwendete Antikörper der immunhistochemischen Färbung der Atmungskettenkomplexe.....	27
Tabelle 3-10:	Chemikalien und Gerät für die immunhistochemische Färbung der Atmungskettenkomplexe.	27
Tabelle 3-11:	Protokoll der immunhistochemischen Färbung der Atmungskettenkomplexe.....	28
Tabelle 3-12:	Verbrauchsmaterial und Geräte der Mauspräparation.	31
Tabelle 3-13:	Zusammensetzung des Zellkulturmediums für die Utrikel.	31
Tabelle 3-14:	Beschichtung der Deckgläser.	31
Tabelle 3-15:	Chemikalien und Geräte zur Behandlung der Utrikel.	33
Tabelle 3-16:	Verbrauchsmaterial und Chemikalien der Färbung mit DAPI. 33	
Tabelle 3-17:	Protokoll der DAPI-Färbung.....	33
Tabelle 3-18:	Verbrauchsmaterial und Chemikalien der Phalloidin-Färbung.....	34
Tabelle 3-19:	Protokoll der Phalloidin-Färbung.....	34
Tabelle 3-20:	Chemikalien und Geräte des LIVE/DEAD®-Assays.	35
Tabelle 3-21:	Protokoll LIVE/DEAD®-Assays.....	36
Tabelle 3-22:	Verbrauchsmaterial und Geräte der RNA-Isolierung für den Microarray.	37
Tabelle 3-23:	Verbrauchsmaterial und Gerät zur Analyse der RNA.....	38

Tabelle 3-24:	Material zur Durchführung des Microarrays.	40
Tabelle 3-25:	Verbrauchsmaterial und Geräte der RNA-Isolierung für die qRT-PCR.	41
Tabelle 3-26:	TaqMan® Sonden der quantitativen Real-Time PCR.....	45
Tabelle 3-27:	Verbrauchsmaterial und Chemikalien für die quantitative Real-Time PCR.....	45
Tabelle 3-28:	Geräte für die quantitative Real-Time PCR.....	45
Tabelle 3-29:	Programm des Real-Time PCR Geräts.....	45
Tabelle 4-1:	Mittelwerte der Quotienten der Intensitätsmessung der Atmungskettenkomplexfärbung Komplex I/Komplex II.	51
Tabelle 4-2:	Mittelwerte der Quotienten der Intensitätsmessung der Atmungskettenkomplexfärbung Komplex IV/Komplex II.	51
Tabelle 4-3:	Genexpressionsanalyse aus Homogenaten des vestibulären Systems	53
Tabelle 4-4:	Die ersten 10 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit AICAR.	59
Tabelle 4-5:	Die ersten 10 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit Bezafibrat.	62
Tabelle 4-6:	Die ersten 10 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Mäuse mit AICAR.	64

Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
ACTB	Actin Beta
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
C57BL/6	C57 black 6
Ca	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
COX	Cytochrom-c-Oxidase
COX3	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 3
CREB	cAMP response element-binding protein
CytB	Cytochrom B
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EthD-1	Ethidium-Homodimer-1
FSK	Forskolin
GPX	Glutathion Peroxidase
GPX3	Glutathion Peroxidase 3
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IVT	In-vitro-Transkription

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP Erk Kinase
mtDNA	Mitochondriale DNA
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
ND1	NADH Dehydrogenase Untereinheit 1
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
NRF2	Nuclear respiratory factor 2
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1 α	Peroxisomaler Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ Co-Aktivator-1 α
PI3K-Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Akt
PKA	Proteinkinase-A
POLG	DNA-Polymerase gamma
PPARs	Peroxisomale Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPAR α	peroxisomaler Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha
Prkaa2	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffmoleküle)
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDH	Succinat-Dehydrogenase
Sirt1	Sirtuin-1
SOD	Superoxid Dismutase
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TFAM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
Timm17a	Translocase of inner mitochondrial membrane 17a
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
ZMP	Imidazolmonophosphat

1 Einleitung

1.1 Schwindel im Alter

Schwindel und Gleichgewichtsstörungen sind, mit einer Prävalenz von ca. 20 % bei den über 75-Jährigen, häufige Altersbeschwerden (Lin and Bhattacharyya, 2012). Dies hat aufgrund der verminderten Lebensqualität und dem erhöhten Risiko von Stürzen eine hohe Relevanz in der alternden Gesellschaft. Bei etwa 60 % der Patienten finden sich keine spezifischen Auslöser, es wird von einer altersabhängigen Degeneration des vestibulären Systems ausgegangen, der sogenannten Presbyastasis (Jung et al., 2009).

Der Lage- und Gleichgewichtssinn entsteht im Zusammenspiel des Vestibularorgans mit dem visuellen und dem propriozeptiven System. Voraussetzung für die Integration aller eingehenden sensorischen Signale ist die intakte Funktion der Nuclei vestibulares, des Cerebellums, des Hippokampus und des primären vestibulären Cortex. Die aufrechte Körperhaltung erfordert die ständige Kontrolle und Rückstellmechanismen der Motorik, besonders der Rumpf- und Beinmuskulatur. Es existieren zahlreiche Rückkopplungsschleifen zwischen der Pyramidenbahn, dem Cerebellum und den Basalganglien. Jedes einzelne Kerngebiet und derer Verbindungen können durch Degeneration oder krankheitsbedingt gestört sein, weshalb die Ätiologie von Schwindel sehr vielfältig ist (Strupp and Brandt, 2008). Die Auslöser reichen von zerebrovaskulären Erkrankungen bis hin zu reversiblen Nebenwirkungen von Medikamenten (Kroenke et al., 2000). Die korrekte Einordnung des Symptoms „Schwindel“ anhand von Anamnese, klinischer Untersuchung und technischer Befunde zählt zu den immanenten Fertigkeiten des gut ausgebildeten und erfahrenen Neurologen. Bei einem großen Teil der Patienten kann zwar eine Störung des vestibulären Systems diagnostiziert, deren Ätiologie jedoch nicht geklärt werden (Park et al., 2001). In Anbetracht der weitreichenden Konsequenz von Schwindel und Gleichgewichtsstörung in einer alternden Gesellschaft besteht dringender Bedarf an der Klärung zugrundeliegender Degenerationsprozesse (Agrawal et al., 2009; Matheson et al., 1999).

1.2 Das vestibuläre System

Das Innenohr des Menschen ist eingebettet in den härtesten Knochen des Körpers, das Felsenbein. Es wird aufgrund des komplexen Kanalsystems auch knöchernes Labyrinth genannt. Zusammen mit dem häutigen Labyrinth bildet es ein „Gehäuse“ für das Hör- und Gleichgewichtsorgan.

Das vestibuläre System wird in einen peripheren und einen zentralen Teil eingeteilt. Abbildung 1-1 zeigt einen schematischen Überblick über das vestibuläre System.

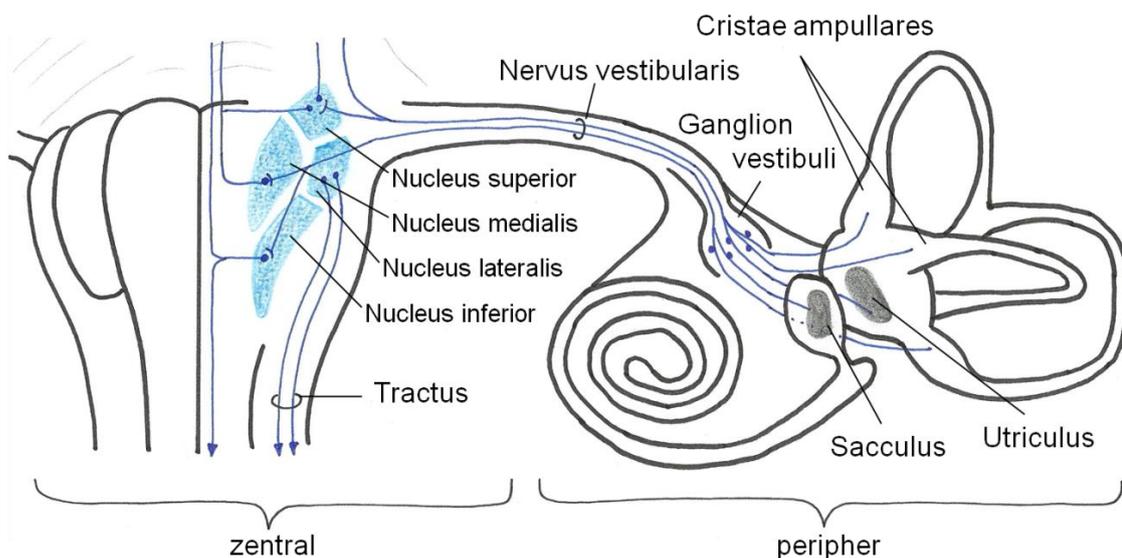


Abbildung 1-1: Das vestibuläre System. Peripheres vestibuläres System mit den drei Cristae ampullares der Bogengänge, der Macula sacculi (Sacculus) und der Macula utriculi (Utriculus). Die Axone der Ganglienzellen des Ganglion vestibuli bilden den Nervus vestibularis. Dieser projiziert in das zentrale vestibuläre System mit den vier Vestibulariskernen, sowie direkt ins Kleinhirn. Abbildung modifiziert nach Taschenatlas der Anatomie – Band 3, Thieme 1991.

1.2.1 Das periphere vestibuläre System

Das Gleichgewichtsorgan besteht aus den drei Bogengängen und den zwei Makulaorganen, Macula sacculi (Sacculus) und Macula utriculi (Utriculus). Die drei fast kreisförmigen Bogengänge, der horizontale sowie der vordere und hintere vertikale Bogengang, sind in den drei Raumdimensionen angeordnet. Jeder Bogengang enthält eine Crista ampullaris, welche Drehbeschleunigungen (Winkelbeschleunigungen) detektiert. Sacculus und Utriculus stehen ebenfalls senkrecht zueinander, wobei der Sacculus bei aufrechter Körperhaltung etwa horizontal liegt. Von den Makulaorganen werden Linearbeschleunigungen regis-

triert. Das Sinnesepithel der Makula- und Bogengangorgane ist aus einigen tausend Stütz- und Haarzellen aufgebaut, wobei anhand morphologischer und physiologischer Charakteristika Haarzellen vom Typ I und Typ II unterschieden werden (Wersall, 1956). Die Haarzellen tragen auf ihrer Oberfläche 60 bis 100 Härchen, sogenannte Stereovilli, sowie ein langes Kinozilium. Diese werden von einer gallertigen Membran aus Mukopolysacchariden bedeckt, welche bei den Makulaorganen kleine Kristalle aus Calciumcarbonat enthält, die Otolithen. Die Gallerte über den Cristae ampullares bezeichnet man als Cupula. Diese enthält keine Kristalle und ist fest am Dach der Bogengangswand angeheftet (siehe Abbildung 1-2).

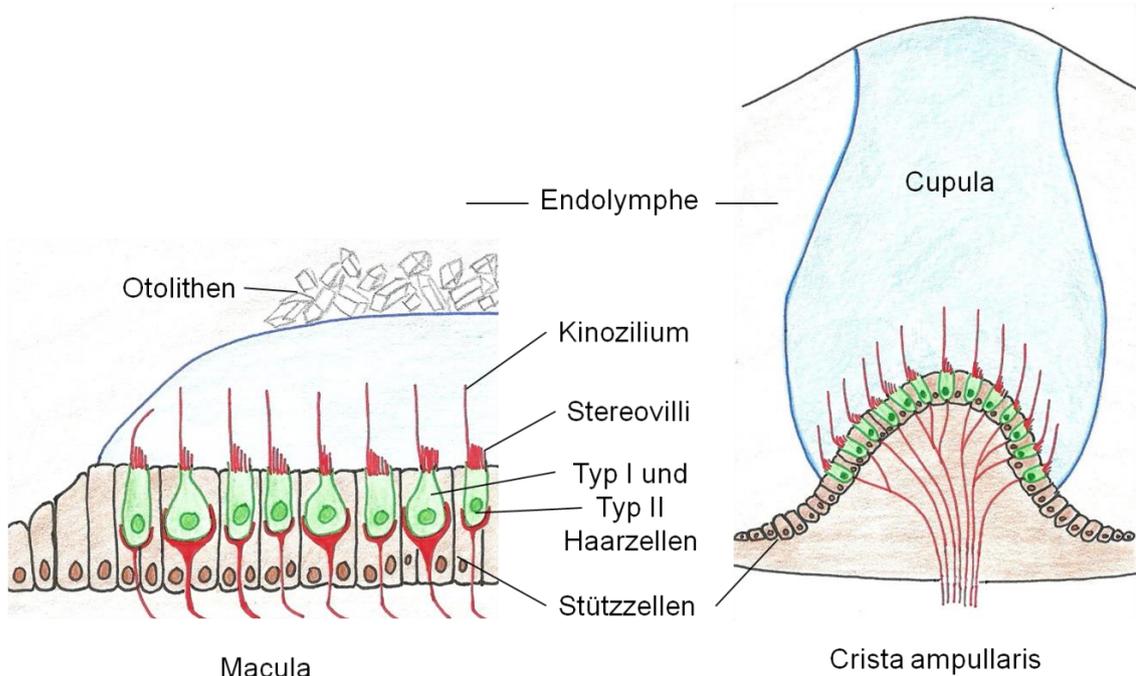


Abbildung 1-2: Ampulle (Crista ampullaris) und Macula. Sinnesepithel aus Stütz- und Haarzellen (Typ I und Typ II). Die Stereovilli und Kinozilien ragen in eine Membran aus Mukopolysacchariden.

Durch Auslenkung der Stereovilli und des Kinoziliums der Haarzellen werden elektrochemische Signale erzeugt, die an die peripheren Dendriten der Zellen des Ganglion vestibuli (Scarpae) übertragen werden (Roberts et al., 1988). Der Nervus vestibularis wird aus den Axonen dieser Ganglienzellen gebildet, welcher zusammen mit dem Nervus cochlearis als Nervus vestibulocochlearis in den Hirnstamm eintritt. Der vestibuläre Teil läuft afferent zu den Vestibulariskernen (Cullen, 2012; Tascioglu, 2005), einige wenige Fasern ziehen direkt ins Kleinhirn.

1.2.2 Das zentrale vestibuläre System

Die primären afferenten Nervenfasern des Nervus vestibularis projizieren hauptsächlich in das Gebiet der Vestibulariskerne in der Medulla oblongata und der kaudalen Brücke. Auf jeder Seite lassen sich anatomisch und funktionell vier Kerne abgrenzen: Der Nucleus superior (Bechterew, SuVe), medialis (Schwalbe, MVe), lateralis (Deiters, LVe) und inferior (Roller, SpVe) (Tascioglu, 2005). Daneben erhalten noch mehrere kleinere Kerne primäre vestibuläre Afferenzen, die jedoch nicht zu den klassischen Vestibulariskernen gezählt werden. Dies sind der Nucleus parasolitaris (Parasolitary nucleus, PsoI) (Barmack et al., 1998), die Y-Gruppe (Blazquez et al., 2000) und der Nucleus intercalatus (Brodal, 1984). Sekundäre vestibuläre Afferenzen ziehen zum Nucleus prepositus hypoglossi, Nucleus x und Nucleus z (Brodal and Pompeiano, 1957).

1.3 Alterungsprozesse im vestibulären System

Schwindel kann bei einem Funktionsverlust eines jeglichen Teils des peripheren oder zentralen vestibulären Systems wahrgenommen werden. Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass sich die messbare Funktion des vestibulären Systems im Alter verschlechtert (Agrawal et al., 2012; Baloh et al., 1993; Baloh et al., 1995). Histopathologische Veränderungen des Gleichgewichtsorgans umfassen einen progressiven Verlust der Haarzellen, eine Degeneration der Otolithen und eine Verminderung der Anzahl der Neurone im Ganglion vestibuli (Scarpa's ganglion) (Igarashi et al., 1993; Rauch et al., 2001; Richter, 1980).

In Untersuchungen an humanen Felsenbeinen wurde eine altersassoziierte Abnahme der Anzahl und Dichte der vestibulären Haarzellen nachgewiesen (Engstrom et al., 1977; Lopez et al., 2005; Rauch et al., 2001; Richter, 1980; Rosenhall, 1973). Rauch et al. zeigten eine lineare Abnahme der Anzahl der Haarzellen in allen fünf Teilen des Vestibularorgans von Geburt bis hin zum hundertsten Lebensjahr. Die Zahl der Typ I Haarzellen verringerte sich schneller in den Cristae ampullares als in den Makulaorganen, die Anzahl der Typ II Haarzellen nahm dagegen gleichmäßig verteilt ab (Rauch et al., 2001). Neben der Degeneration wurden altersabhängig verschiedene zytologische Veränderungen festgestellt, wie intrazelluläre Lipofuszingranula, Vakuolen und der Er-

satz von Haarzellen durch Narbengewebe und Fibrose (Rosenhall and Rubin, 1975).

Studien zur altersabhängigen Degeneration im vestibulären System gestalten sich jedoch schwierig, da die post-mortem Probengewinnung von klinisch gut untersuchten Personen ein Hindernis darstellt. Die meisten Studien beschränken sich außerdem aus anatomischen Gründen auf einzelne Strukturen, zudem kann es durch die zuvor nötige Dekalzifizierung des Temporalknöchens zu Beschädigung der zu untersuchenden Strukturen kommen. Aus diesen Gründen bieten Daten aus Tier- und Zellkulturmodellen wichtige Anhaltspunkte für die Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen von altersabhängigen Degenerationsprozessen.

1.4 Molekulare Mechanismen des Alterns – Erkenntnisse aus dem auditorischen System

Für das „benachbarte“ auditorische System gibt es deutlich mehr pathophysiologische Daten zur altersabhängigen Degeneration. Aufgrund der engen entwicklungs geschichtlichen Verbindung des Sacculus und der Cochlea geben Alterungsprozesse im auditorischen System Hinweise für die Alterungsmechanismen des vestibulären Systems. Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis) ist eine häufige Krankheit im Alter (Lin et al., 2011).

In Analogie zu Alterungsmechanismen anderer Gewebe und Organe, wird für die Entstehung der Presbyakusis ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren im Sinne einer multifaktoriellen Genese angenommen (Keithley, 2020). Zu den exogenen Faktoren zählen in der Cochlea vor allem die Lärmexposition, sowie die akute oder chronische Exposition ototoxischer Substanzen und Medikamente. Zu den intrinsischen Faktoren zählt vor allem die individuelle genetische Ausstattung einer Person, aber auch metabolischer Stress (Hypoxie und Entzündung) und oxidativer Stress. In variabler Kombination führen diese Faktoren zu einer mitochondrialen Dysfunktion (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004) und bei Akkumulation der Schäden über einen individuellen Schwellenwert zum programmierten Zelltod, der Apoptose (Someya et al., 2008). Abbildung 1-3 zeigt ein vereinfachtes Flussdiagramm zur Entstehung von Altersschwerhörigkeit durch die genannten Faktoren und mögliche therapeutische Ansatzpunkte (nach Yamasoba et al. (2013)).

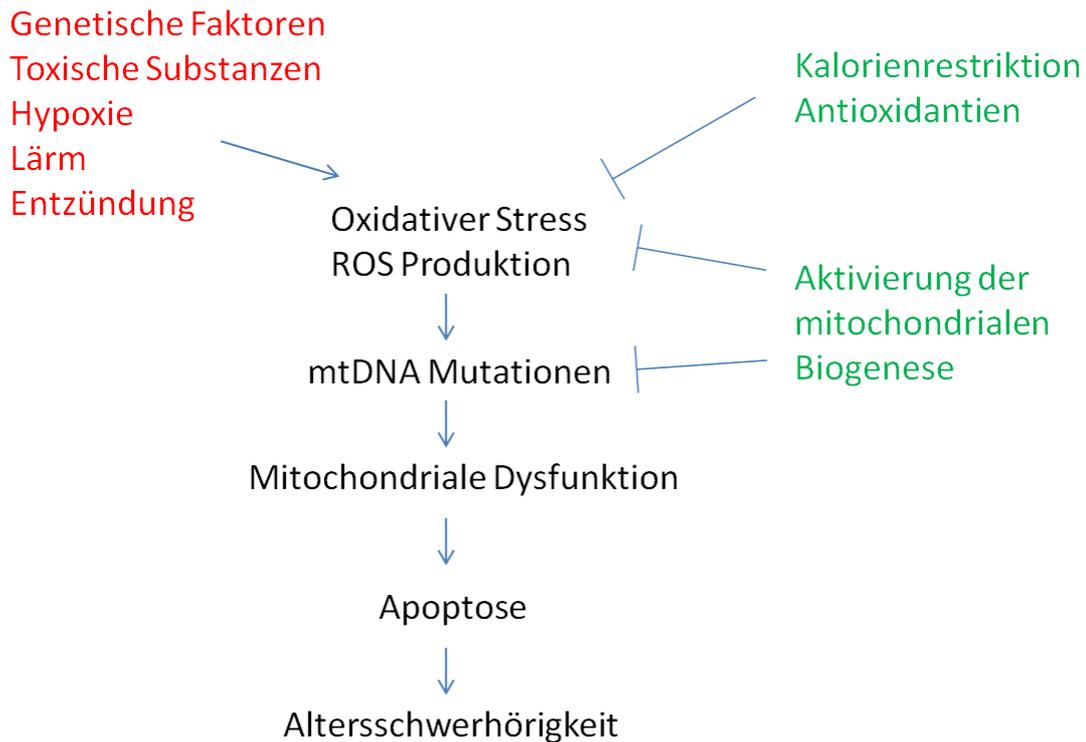


Abbildung 1-3: Modell zur Entstehung von Altersschwerhörigkeit. Negative Einflüsse (rot) führen zu oxidativem Stress und der Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen („reactive oxygen species“, ROS). In der Folge kommt es zu Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA), einer daraus resultierenden mitochondrialen Dysfunktion und schließlich zur Apoptose. Verschiedene positive Einflussfaktoren (grün) stellen mögliche therapeutische Ansätze dar. Nach Yamasoba et al. (2013).

In den folgenden Abschnitten wird auf diese Aspekte und mögliche Beeinflussungen zur Verzögerung des Alterungsprozesses eingegangen.

1.4.1 Oxidativer Stress

Ein zentraler Prozess, der zu altersabhängigen degenerativen Veränderungen beizutragen scheint, ist die Generierung von reaktiven Sauerstoffmolekülen („reactive oxygen species“, ROS) (Cheng et al., 2005; Someya et al., 2009). Diese beschädigen die nukleäre sowie die mitochondriale Desoxyribonukleinsäure („mitochondrial desoxyribonucleic acid“, mtDNA), Membranen und Proteine. Zelluläre „Abwehrmechanismen“, wie die Superoxid Dismutase (SOD), die Katalase, die Glutathion S-Transferase (GST) und die Glutathion Peroxidase (GPX), können ROS neutralisieren (Halliwell and Gutteridge, 2007). Bei gealterten Fischer 344 Ratten wurde eine altersabhängig erhöhte Aktivität der GPX in der Stria vascularis und dem Spiralligament der Cochlea beobachtet (Coling et al., 2009). Der altersassoziierte Verlust von cochleären Haarzellen war bei

Mäusen, welchen das antioxidative Enzym SOD1 fehlte, erhöht (McFadden et al., 1999). Zudem trat eine starke Degeneration der Neurone im Spiralganglion bei älteren SOD1-knockout Mäusen auf (Keithley et al., 2005). Dagegen führte eine Überexpression von Katalase in den Mitochondrien zu einem verminderten oxidativen Schaden der DNA und einer verlangsamten Entwicklung von Altersschwerhörigkeit bei C57BL/6 Mäusen (Someya et al., 2009).

Eine oxidative Schädigung in der Cochlea resultiert somit im Mausmodell zum einen aus der Abnahme der antioxidativen Kapazität, und zum anderen aus dem erhöhten Aufkommen von ROS. Eine bereits seit vielen Jahrzehnten propagierte protektive Strategie ist daher auch die Supplementierung von antioxidativen Substanzen. In verschiedenen Studien an Mäusen führte dies zu einer Verbesserung der Altersschwerhörigkeit und geringerer Degeneration der Cochlea (Seidman, 2000; Someya et al., 2009). Die Ergebnisse variieren allerdings stark je nach Dauer und Art der antioxidativen Substanz.

Eine weitere Strategie ist die Kalorienrestriktion, das heißt eine Verminderung der mit der Nahrung aufgenommenen Kalorienzahl um 30 bis 50 Prozent, mit positiven Effekten für den gesamten Organismus (Colman et al., 2009). Altersschwerhörigkeit, Verlust der cochleären Haarzellen und Neurone, sowie oxidativer Stress sind dadurch bei Mäusen in der Cochlea reduziert (Seidman, 2000; Someya et al., 2007).

1.4.2 Mitochondrien und Apoptose

Mit steigendem Alter treten vermehrt Mutationen und Deletionen der mtDNA im menschlichen Innenohr auf (Bai et al., 1997; Fischel-Ghodsian et al., 1997; Markaryan et al., 2009, 2010) und wurden deshalb in Zusammenhang mit Altersschwerhörigkeit gebracht (Bai and Seidman, 2001; Nakada et al., 2004; Seidman, 2000; Yamasoba et al., 2007). Unter den verschiedenen Theorien des Alterns scheint im auditorischen System im Wesentlichen die mitochondrial vermittelte Degeneration eine Rolle zu spielen. Im Folgenden soll dargelegt werden, wie eine mitochondriale Störung altersabhängig zu Stande kommt.

Mitochondrien sind an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, jedoch ist ihre wichtigste Funktion die Produktion des Energiebedarfs der Zellen. Über oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) stellen sie an ihrer inneren Membran mit Hilfe der Atmungskette Adenosintriphosphat (ATP) her, zudem finden in

den Mitochondrien β -Oxidation und Citratzyklus statt. Die Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen (den sog. Atmungskettenkomplexen I-IV), der ATP-Synthase (Atmungskettenkomplex V), sowie dem Wasserstoff- bzw. Elektronenüberträger Ubichinon (Coenzym Q) und Cytochrom c. Ein Großteil der insgesamt 90 Proteine der Atmungskettenkomplexe ist im Zellkern kodiert. Diese werden nach der Transkription in die Mitochondrien importiert und verbinden sich mit den 13 mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette. Wie aus Abbildung 1-4 zu entnehmen ist, sind die Komplexe I, III und IV auch mitochondrial kodiert, Komplex II ist ausschließlich nukleär kodiert (Scarpulla, 2008). Dies erfordert komplexe Regulationsmechanismen für ein funktionierendes OXPHOS-System.

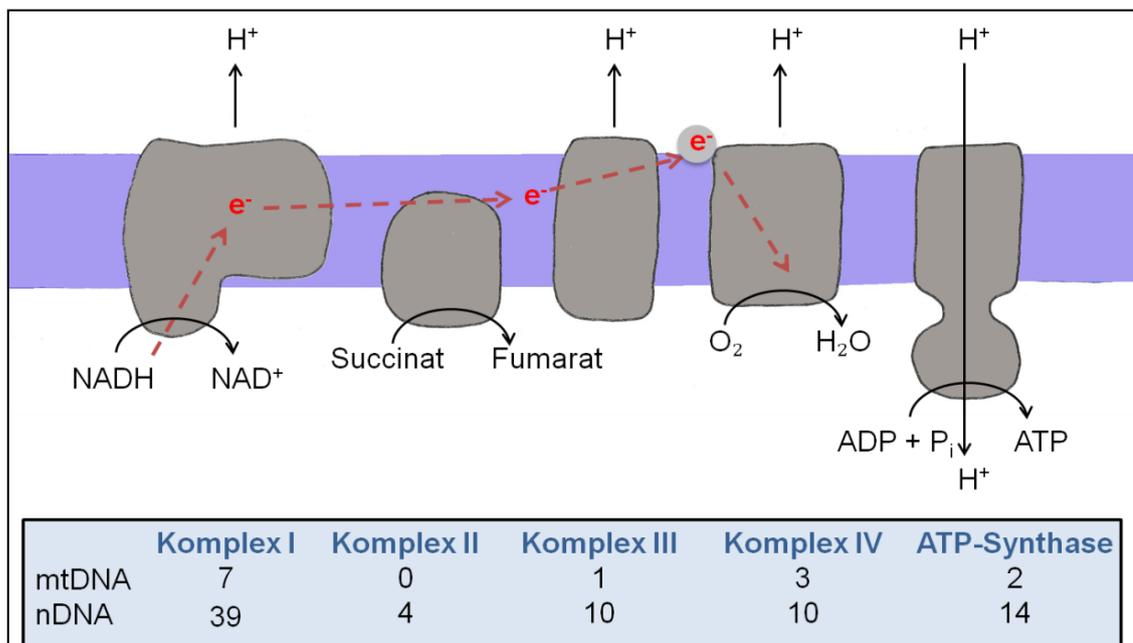


Abbildung 1-4: Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran. Im Stoffwechsel entstandene Elektronen (e^-) werden über Zwischenstufen auf Sauerstoff (O_2) übertragen, wodurch ein Protonengradient aufgebaut wird. Darüber kann Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) synthetisiert werden. Die Proteinuntereinheiten der fünf Atmungskettenkomplexe werden zu unterschiedlichen Anteilen von nukleären und mitochondrialen Genen kodiert. Nach Scarpulla (2008).

Nach der mitochondrialen Theorie des Alterns von Denham Harman entstehen in der Atmungskette ROS, welche die mtDNA schädigen (Harman, 1972). Die Akkumulation der mtDNA-Schäden führt zu Defekten der Atmungskette, woraus wiederum eine höhere ROS-Produktion und vermehrter oxidativer Stress resultieren. Da die Mitochondrien die Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies dar-

stellen (Lin and Beal, 2006; Wallace, 2005), werden diese am stärksten durch oxidativen Stress geschädigt (Miquel et al., 1980). Diese Theorie wird durch Studien gestützt, die zeigen, dass sich Punktmutationen und Deletionen der mtDNA mit dem Alter in verschiedenen Geweben anreichern (Khaidakov et al., 2003). Besonders betroffen davon sind Gewebe mit einem hohen Energieverbrauch wie Herz, Skelettmuskel und Gehirn (Krishnan et al., 2007).

Neben einer altersabhängigen Schädigung der Mitochondrien bestehen auch angeborene Defekte der mitochondrialen Atmungskette. Mitochondriale Krankheiten stellen die häufigste Gruppe angeborener Stoffwechselstörungen dar und betreffen etwa 1:5000 Menschen (Skladal et al., 2003). Größtenteils sind das Muskelgewebe sowie das Nervensystem betroffen (DiMauro and Schon, 2003). Interessanterweise sind Taubheit und altersabhängiger Hörverlust regelmäßig auftretende Symptome bei Patienten mit Mitochondriopathien (Kanungo et al., 2018; Kokotas et al., 2007), was sich auch in Mausmodellen zeigte (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004).

Ein Resultat der mitochondrialen Dysfunktion scheint die Auslösung von Apoptose zu sein (Yamasoba et al., 2013). Über den intrinsischen, mitochondrial vermittelten Signalweg werden pro-apoptotische Mediatoren aus den Mitochondrien freigesetzt. Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen anti-apoptotischen Proteinen, wie „B-cell lymphoma 2“ (Bcl-2), und den pro-apoptotischen Proteinen, wie Bcl-2-assoziiertes Protein X (Bax), „Bcl-2-antagonist/killer“ (Bak) und „BH3-interacting domain death agonist“ (Bid) (Lindsten et al., 2000; Youle and Strasser, 2008). Oxidativer Stress induziert die Expression von Bak in cochleären Zellen und ist im Alter in der Cochlea vermehrt exprimiert. Das Fehlen von Bak schützt vor Apoptose der cochleären Haarzellen und Neurone im Spiralganglion, sowie in der Folge vor Altersschwerhörigkeit (Someya et al., 2009).

Die Erkenntnisse aus dem auditorischen System implizieren, dass mögliche Mechanismen des Alterns erhöhter oxidativer Stress und eine mitochondriale Dysfunktion sind. Diese verstärken sich in einem „Circulus vitiosus“ (Teufelskreis) und führen letztlich zu Apoptose sowie dem Verlust der Haarzellen und Neurone der Cochlea. Oxidativer Stress wird möglicherweise durch vermehrte Mutationen und Deletionen der mtDNA und der daraus folgenden mitochondrialen Fehlfunktion verstärkt (Markaryan et al., 2008; Yamasoba et al., 2013). Das

vestibuläre System wurde bislang nicht auf Degenerationsprozesse und mögliche zugrunde liegende Mechanismen untersucht. Die vorliegende Arbeit analysiert daher in Anlehnung an die Erkenntnisse aus dem auditorischen System Degenerationsmechanismen anhand eines Mausmodelles für eine mitochondriale Störung.

1.5 Regulation der mitochondrialen Biogenese

Durch die lebenslang stattfindende mitochondriale Biogenese wird die Regeneration der Mitochondrien sichergestellt und auch die Anzahl der Mitochondrien an den Energieverbrauch des Gewebes angepasst (Hock and Kralli, 2009; Scarpulla, 2008). Funktionsstörungen der Mitochondrien können durch maternale und mendelsche Vererbung oder durch spontane Keimbahnmutationen in der mtDNA entstehen (Taylor and Turnbull, 2005). Für die Replikation und Transkription der zirkulären 16.6 kb mtDNA sind verschiedene nukleär kodierte Proteine nötig, wie die DNA-Polymerase γ (POLG), die Twinkle-Helikase und das mitochondriale ssDNA-binding Protein (mtSSB). Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) kontrolliert die Anzahl der mtDNA-Kopien („mtDNA copy number“) (Ekstrand et al., 2004). Mutationen in diesen Genen, sowie Mutationen oder Deletionen der mtDNA, können zu Funktionsstörungen der Mitochondrien führen (Falkenberg et al., 2007; Shoubridge, 2001).

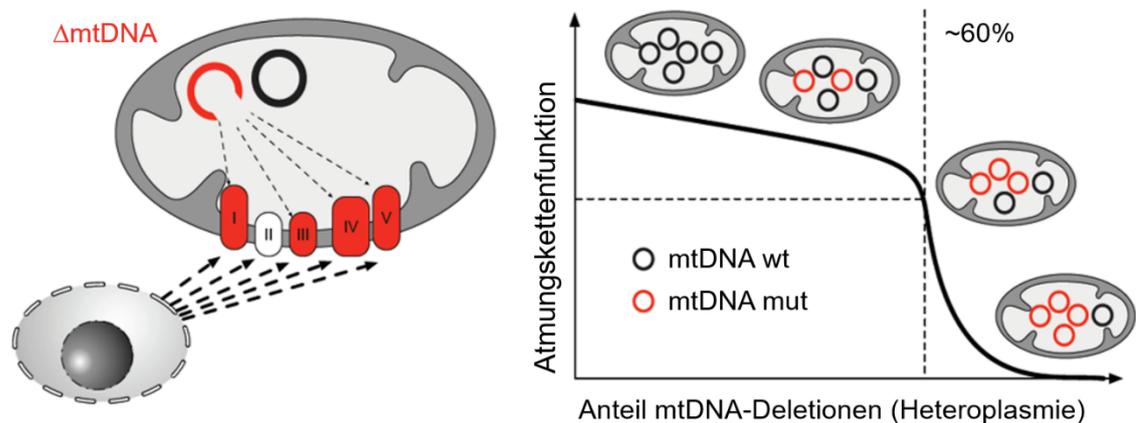


Abbildung 1-5: Schwellenwert der mutierten mtDNA (Δ mtDNA). Gleichzeitiges Vorliegen mutierter (mtDNA mut) und Wildtyp-mtDNA (mtDNA wt) innerhalb einer Zelle (Heteroplasmie). Erst ab einem Anteil von ca. 60 % mutierter mtDNA kommt es zur Reduktion der Atmungskettenfunktion. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Matthias Elstner.

Viele der pathogenen mtDNA-Mutationen sind heteroplasmisch, das heißt sie kommen neben einem unterschiedlichen Prozentsatz an Wildtyp-mtDNA vor. Erst ab einem Anteil von über 50 - 60 % mutierter mtDNA (Δ mtDNA) treten klinische Symptome auf (Larsson and Clayton, 1995) (siehe Abbildung 1-5). Hieraus resultiert die Hypothese, dass die schädliche Wirkung der mtDNA-Mutationen durch die Erhöhung der Anzahl der Mitochondrien und somit der aktiven Atmungskettenuntereinheiten überwunden werden kann (Bastin et al., 2008; Wenz et al., 2008).

Die mitochondriale Biogenese wird durch nukleäre und mitochondriale Faktoren gesteuert. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der mitochondrialen Biogenese spielt der peroxisomale Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ Co-Aktivator-1 α (PGC-1 α) (Puigserver et al., 1999; Wu et al., 1999). PGC-1 α ist ein kotranskriptioneller Regulationsfaktor, welcher andere für die mitochondriale Biogenese wichtige Transkriptionsfaktoren aktiviert (siehe Abbildung 1-6). Zu diesen Faktoren zählen „Nuclear respiratory factor 1“ (NRF1), „Nuclear respiratory factor 2“ (NRF2) und die peroxisomalen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs). NRF1 und NRF2 induzieren die Expression verschiedener kernkodierter Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette sowie Gene, die beteiligt sind an der Replikation und Transkription der mtDNA, wie TFAM (Kelly and Scarpulla, 2004). PPARs sind intrazelluläre Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren und von Fettsäuren oder deren Derivaten aktiviert werden. Es sind derzeit drei PPAR-Subtypen (α , β/δ , γ) bekannt, die sich in ihrer lokalen Expression und Funktion unterscheiden. Gemeinsam ist ihnen jedoch die Induktion von Genen, die in Peroxisomen und Mitochondrien an der Aufnahme von Fettsäuren und deren Oxidation beteiligt sind (Lefebvre et al., 2006).

PGC-1 α wird durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung und Deacetylierung, aktiviert. Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) phosphoryliert PGC-1 α direkt (Jager et al., 2007). Die AMPK ist eine heterotrimäre Proteinkinase, welche aus einer katalytischen (α) und zwei regulatorischen (β und γ) Untereinheiten besteht (Hardie, 2007). Sie wird durch die Veränderung des ATP- und Adenosinmonophosphat (AMP)-Spiegels in der Zelle reguliert. Fällt der ATP-Spiegel, steigt der AMP-Spiegel an, da AMP ein Abbauprodukt von ATP ist. Dadurch spielt die AMPK eine wichtige Rolle bei der Aktivie-

Die Regulation der mitochondrialen Biogenese bei Energiemangel (Hardie, 2004; Hardie and Sakamoto, 2006; Kahn et al., 2005). In Anwesenheit von AMP oder Imidazolmonophosphat (ZMP) kann die AMPK aktiviert werden. Dies geschieht durch Phosphorylierung an Threonin 172 durch die Leberkinase B1 (LKB1) oder die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase β (CaMKK β) (Hardie and Sakamoto, 2006). Neben der Anregung der mitochondrialen Biogenese inaktiviert die AMPK auch energieverbrauchende Signalwege und aktiviert die ATP-Produktion über die mitochondriale Atmungskette und β -Oxidation.

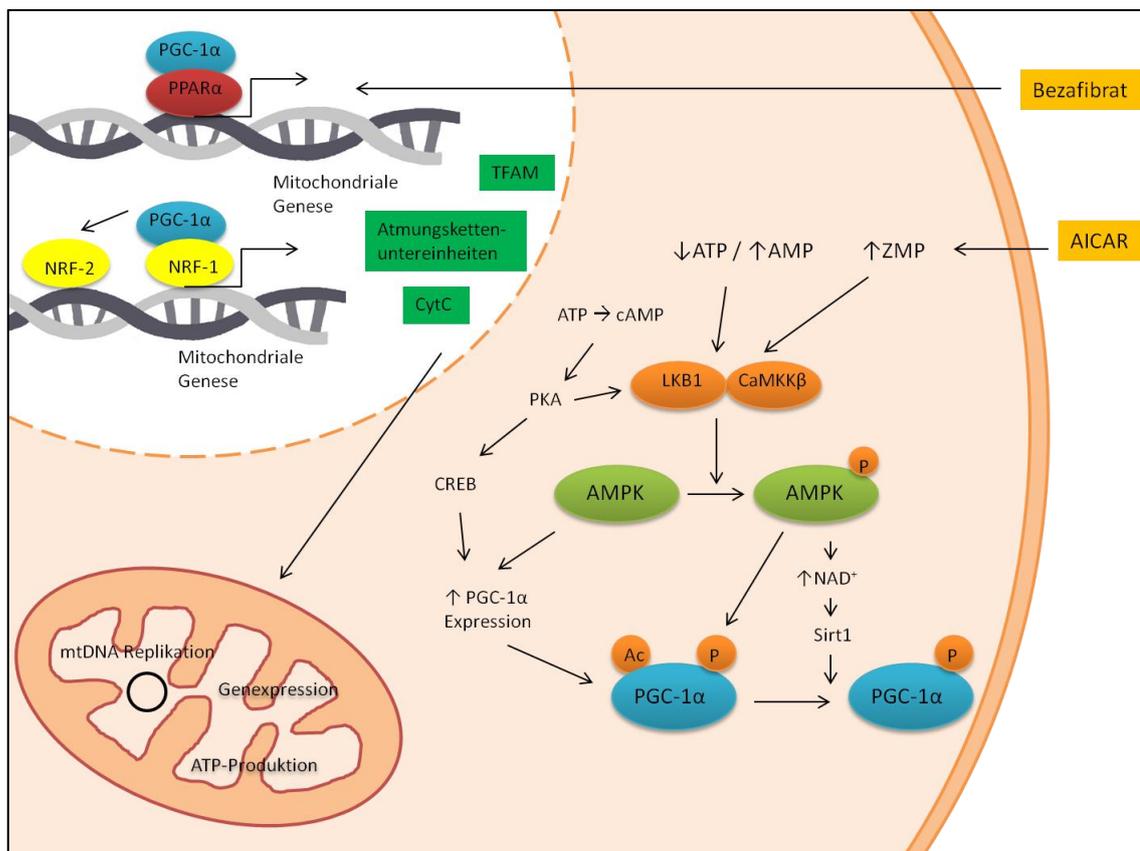


Abbildung 1-6: Mitochondriale Biogenese. Der peroxisomale Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ Co-Aktivator-1 α (PGC-1 α) aktiviert im Zellkern Transkriptionsfaktoren wie „Nuclear respiratory factor 1“ (NRF1), „Nuclear respiratory factor 2“ (NRF2) und die peroxisomalen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs). Diese induzieren die Expression von Atmungskettenuntereinheiten sowie mitochondriale Transkriptionsfaktoren, wie den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM). Zudem werden Proteine der mitochondrialen Atmungskette, wie Cytochrom c (CytC) exprimiert. Aktivierung von PGC-1 α durch posttranslationale Phosphorylierung durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und Deacetylierung durch Sirtuin-1 (Sirt1). Die mitochondriale Biogenese kann pharmakologisch induziert werden durch 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid (AICAR) und Bezafibrat.

Die AMPK aktiviert PGC-1 α aber auch indirekt über die Aktivierung der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺)-abhängigen Deacetylase Sirtuin-1 (Sirt1), welche PGC-1 α deacetyliert und somit aktiviert. Ein erhöhtes NAD⁺/NADH Verhältnis stimuliert Sirt1 als Folge der erhöhten Expression von Genen der β -Oxidation durch die AMPK (Canto et al., 2009). PGC-1 α und die PPARs können auch pharmakologisch stimuliert oder induziert werden. Hierfür kommen 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonukleosid (AICAR), ein AMPK-Agonist (Corton et al., 1995; Merrill et al., 1997), und Bezafibrat, ein PPAR-Panagonist (Tenenbaum et al., 2005), in Frage.

1.6 Pharmakologische Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese

1.6.1 AICAR

AICAR ist strukturell ähnlich zu Adenosin und wird von der Zelle aufgenommen. Dort wird es von der Adenosinkinase zu ZMP phosphoryliert, welches ein Analogon von AMP ist. ZMP hat somit ähnliche Effekte auf die Zelle wie AMP, wie z. B. die Aktivierung der AMPK. Es konnte gezeigt werden, dass AICAR die mitochondriale Biogenese in vitro sowie in vivo anregt. Die Behandlung von Komplex-I-defizienten Fibroblasten mit AICAR führte zu einer erhöhten ATP-Produktion und einer Verringerung der Produktion von ROS (Golubitzky et al., 2011). Nach einmonatiger Injektion von AICAR bei Ratten erhöhte sich die Anzahl der Mitochondrien im Muskelgewebe (Winder et al., 2000). Zudem wurde bei Cytochrom-c-Oxidase (COX)-defizienten Mäusen (Sco^{KO/KI}) eine 1,5-fache Zunahme von PGC-1 α im Skelettmuskel beobachtet (Viscomi et al., 2011). Auch im peripheren und zentralen Nervensystem zeigt AICAR einen positiven Effekt auf die mitochondriale Biogenese. Obwohl AICAR die Blut-Hirnschranke nur zu einem geringen Anteil passieren kann (Marangos et al., 1990), führte die periphere Injektion von AICAR zu einer positiven Beeinflussung der kognitiven Leistung bei gesunden Mäusen. Durch die Behandlung von jungen (ca. sechs Wochen alten) und alten (23 Monate alten) Mäusen mit AICAR zeigte sich ein verbessertes Raumgedächtnis sowie ein Anstieg von Genen, die für die neuronale Entwicklung und Plastizität relevant sind (Kobilo et al., 2014).

1.6.2 Bezafibrat

Bezafibrat ist ein lipidsenkender Wirkstoff aus der Gruppe der Fibrate. Der Arzneistoff wird zur Behandlung von primären und sekundären Hyperlipidämien eingesetzt (Goa et al., 1996). Die Effekte beruhen auf einer Aktivierung der PPAR-Rezeptoren (α , β/δ , γ). Somit ist Bezafibrat ein PPAR-Pan-Agonist (Tenenbaum et al., 2005). Durch die Behandlung von Fibroblasten mit fehlerhaftem Komplex I, II oder IV mit Bezafibrat konnte bereits in vitro der positive Effekt von Bezafibrat auf die mitochondriale Biogenese nachgewiesen werden (Bastin et al., 2008; Golubitzky et al., 2011).

Dies zeigte sich auch in Mausmodellen für mitochondriale Krankheiten. Bei Mäusen mit einem COX-Defizit wurde durch Bezafibrat die COX-Aktivität in gleichem Maße wie durch eine PGC-1 α -Überexpression verbessert (Wenz et al., 2008). Zudem wurde an einem anderen Mausmodell mit COX-Mangel (Surf1^{-/-} Mäuse) gezeigt, dass Bezafibrat im Skelettmuskel die Expression von PPAR α , PPAR β/δ und Genen der β -Oxidation induziert, jedoch nicht den Anteil der mtDNA und die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette erhöht (Viscomi et al., 2011). Bei den sogenannten „Deletor“-Mäusen, welche eine mutierte Twinkle-Helikase exprimieren, verzögerte Bezafibrat die Progression der Myopathie (Yatsuga and Suomalainen, 2012). Die mitochondriale Biogenese wurde allerdings nicht angeregt.

Auch in neuronalem Gewebe zeigte Bezafibrat einen positiven Effekt auf die mitochondriale Biogenese. In einem Mausmodell mit vorderhirnspezifischer COX-Defizienz führte die Behandlung mit Bezafibrat zu einem Anstieg der mitochondrialen Proteine und einer Steigerung der COX-Aktivität. Außerdem war die Expression von TFAM und PGC-1 α erhöht (Noe et al., 2013).

Somit wurde bereits in verschiedenen Geweben ein Effekt von AICAR und Bezafibrat auf die mitochondriale Biogenese gezeigt, weshalb diese Substanzen in dieser Arbeit zur Behandlung des hier etablierten Zellkulturmodelles verwendet wurden.

1.7 Mausmodell „mtDNA-mutator“-Maus

Wichtige Daten zur Pathogenese der mitochondrialen Dysfunktion resultieren aus der Untersuchung eines 2005 vorgestellten Mausmodells. Bei der sogenannten „mtDNA-mutator“-Maus liegt die Mutation D257A in der POLG vor,

wodurch die Korrekturlesefunktion der Polymerase beeinträchtigt ist. Dadurch weisen die betroffenen Zellen vermehrt somatische mtDNA-Deletionen und -Mutationen auf. Bei der Geburt der Mäuse kann die „mtDNA-mutator“-Maus phänotypisch zunächst nicht von den Wildtyp-Mäusen unterschieden werden, im Alter von neun Monaten jedoch zeigt sich ein frühzeitiger Alterungsphänotyp (Kujoth et al., 2005). Die Mäuse weisen einen Haarverlust (Alopezie) auf und das Fell ergraut (siehe Abbildung 1-7). Zudem verkürzt sich die Lebenszeit um die Hälfte (850 Tage Wildtyp, 416 Tage „mtDNA-mutator“). Es konnten eine Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis) und ein Muskelschwund (Sarkopenie) festgestellt werden (Kujoth et al., 2005) sowie Gewichtsverlust, reduziertes subkutanes Fettgewebe, Osteoporose, Kyphose, Anämie, reduzierte Fruchtbarkeit und eine Hypertrophie des Herzens (Trifunovic et al., 2004).

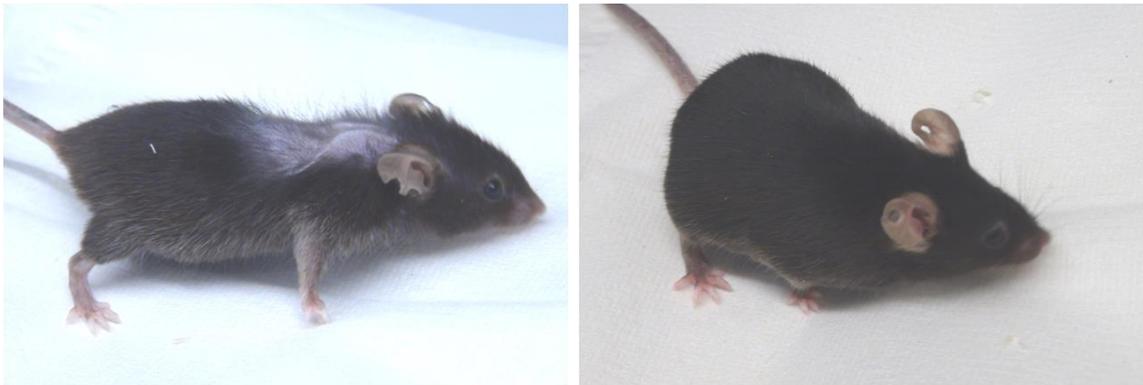


Abbildung 1-7: Äußerer Phänotyp der „mtDNA-mutator“-Maus im Alter von ca. 13 Monaten (links) im Vergleich zu gleichaltriger Wildtyp-Maus (rechts). Zu sehen sind eine verstärkte Kyphose, sowie ein Haarverlust (Alopezie) und ergrautes Fell.

Die Mutationen verteilen sich gleichmäßig in den verschiedenen Geweben. Bei der „mtDNA-mutator“-Maus ließen sich drei- bis achtmal mehr Mutationen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nachweisen, welche sich zufällig auf die Gene für die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe verteilen (Trifunovic et al., 2004). Histologische Analysen ergaben erstaunlicher Weise und entgegen der bisherigen „Lehrmeinung“, dass in den Geweben kein messbar erhöhter oxidativer Stress vorliegt (Trifunovic et al., 2005). Dies wird auch als Erklärung diskutiert, warum die Mutationen linear zur Lebenszeit der Mäuse akkumulieren und nicht exponentiell, wie zunächst angenommen (Mitochondriale Theorie des Alterns, siehe 1.4.2) (Trifunovic et al., 2005). Dagegen konnte gezeigt werden, dass Apoptose ein zentraler Mechanismus bei Gewebefunktionsstörungen

durch vermehrte Bildung von mtDNA-Mutationen ist (Kujoth et al., 2005). Bei der Kultivierung von embryonalen Mausfibroblasten („Mouse Embryonic Fibroblasts“, MEF), welche aus „mtDNA-mutator“-Mäusen gewonnen wurden, konnte eine beeinträchtigte Funktion der Atmungskette nachgewiesen werden (Trifunovic et al., 2005).

Die „mtDNA-mutator“-Maus wurde zur Untersuchung der vorliegenden Fragestellung verwendet, insbesondere da bereits von anderen Arbeitsgruppen Alterungsprozesse in der Cochlea gezeigt wurden (Niu et al., 2007; Someya et al., 2008). Ein Ziel der Arbeit war, zu untersuchen, ob dies auch für das vestibuläre System zutrifft, welches in den bisherigen Studien nicht eingehend untersucht worden war. Die „mtDNA-mutator“-Maus ermöglicht die Untersuchung der mitochondrialen Beteiligung und möglicherweise die Entwicklung therapeutischer Strategien. Da Studien und Therapien an Mausmodellen sehr aufwändig sind, besteht der zweite Teil der Arbeit aus der Etablierung eines Explantationsmodells. Hierdurch wurde die Untersuchung von verschiedenen Substanzen zur Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese ermöglicht. Als mitochondriale Aktivatoren wurden AICAR und Bezafibrat eingesetzt, um zu untersuchen, ob sie im etablierten Zellkulturmodell einen Einfluss haben. Als Methode wurde eine Microarray-basierte Genexpressionsanalyse verwendet.

1.8 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

1.8.1 Phänotypisierung der „mtDNA-mutator“-Mäuse

Homozygote „mtDNA-mutator“-Mäuse zeigen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, deutlich Stigmata des vorzeitigen Alterns. Der Phänotyp umfasst unter anderem eine Alopezie, einen Gewichtsverlust, eine Kyphose, sowie Schwerhörigkeit (Trifunovic et al., 2004). Insbesondere die Schwerhörigkeit (Presbyakusis) gilt als typisches Phänomen des Alterns und wurde bereits in anderen Mausmodellen mit mitochondrialer Fehlfunktion beschrieben. Ursächlich zeigt sich eine Degeneration der cochleären Haarzellen (Yamasoba et al., 2007). Daneben weisen diese Mäuse aber auch eine Muskelschwäche auf und sind weniger aktiv, was die Beurteilung der Motorik und der Koordination erschwert.

Um eine Beeinträchtigung der vestibulären Funktion zu testen, wurden in Kooperation mit der German Mouse Clinic München (Prof. Dr. med. Thomas Klopstock und Dr. rer. nat. Lore Becker) eine „Ganganalyse“, ein sogenannter

„Schwimmtest“ sowie verschiedene Gleichgewichtstests durchgeführt. Dazu zählen ein beschleunigendes Rotierad („Rotarod performance test“), verschiedene Gitter und Leitern und das „DigiGait“-System. Es wurden gealterte homozygote „mtDNA-mutator“-Mäuse (13 – 14 Monate) im Vergleich zu Kontrollen untersucht.

Im „Schwimmtest“ zeigten die „mtDNA-mutator“-Mäuse und die Kontrolltiere die gleiche Leistung. Allerdings ergaben sich Hinweise auf einen erhöhten Ataxie-Koeffizienten. Die Ergebnisse zur Messung des Gleichgewichts und der Koordination von Dai et al. konnten bestätigt werden (Dai et al., 2013). Alte homozygote „mtDNA-mutator“-Mäuse fielen schneller vom Rotierad als Kontrolltiere (Brosel et al., 2012). Beim Überqueren eines erhöhten Balkens benötigten die homozygoten Mäuse mehr Zeit und stoppten häufiger.

In der zusammenfassenden Beurteilung zeigte sich somit eine ataktische motorische Störung der Mutanten. Diese war jedoch nicht spezifisch für eine vestibuläre Störung, sondern eher multifaktoriell bedingt. Eine zusätzliche zentrale oder periphere vestibuläre Störung war jedoch nicht auszuschließen.

1.8.2 Deletionsbestimmung im Felsenbein der „mtDNA-mutator“-Mäuse

Bevor der schädigende Effekt von Deletionen der mtDNA im vestibulären System untersucht wurde, wurde das Auftreten von mtDNA-Deletionen im Felsenbein der 13 bis 14 Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäuse mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) überprüft (siehe Abbildung 1-8A). Es wurden drei Gene, welche gleichmäßig verteilt auf dem mitochondrialen DNA-Molekül liegen, quantifiziert (NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1 (ND1), beginnend an Position mt2752; Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 3 (COX3), beginnend an Position mt8609; und Cytochrom B (CytB), beginnend an Position mt14148) (siehe Perier et al. (2013)).

Das vestibuläre System wurde von der Cochlea abgetrennt und beide Systeme unabhängig untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Strukturen die Anzahl der Deletionen in den „mtDNA-mutator“-Mäusen ca. das Fünffache im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beträgt, wobei das vestibuläre System noch etwas stärker betroffen ist als die Cochlea (Brosel et al., 2012). Deletionen der mtDNA akkumulieren auch im Alterungsprozess von Kontrolltieren, was bereits

in anderen Geweben beschrieben wurde (Kujoth et al., 2005; Perier et al., 2013; Trifunovic et al., 2004).

Eine zusätzliche Analyse durch qRT-PCR ermöglichte die Berechnung der Anzahl der mtDNA-Kopien („mtDNA copy number“) (siehe Abbildung 1-8B). Hierfür wurde zudem Actin Beta (ACTB) unter Verwendung der gleichen Menge an DNA-Input quantifiziert. Die Deletionenanzahl wurde zu Blut und Leber eines Wildtyp-Tiers normalisiert. Zur Berechnung der Deletionen wurden alle möglichen Kombinationen der Genverhältnisse (ND1/CytB; ND1/COX3; CytB/COX3; CytB/ND1; COX3/ND1; COX3/CytB) berechnet und die maximale Deletionenanzahl vermerkt. Die relative Anzahl der mtDNA-Kopien wurde bestimmt, indem die höchste Menge der drei mitochondrialen DNA-Gene mit ACTB verglichen wurde. Die Anzahl der mtDNA-Kopien stieg im Vestibularsystem auf das Sechsfache und in der Cochlea auf das 2,5-fache im Vergleich zu Kontrolltieren an. In allen Tieren korreliert die Anzahl der mtDNA-Moleküle positiv mit der Anzahl der Deletionen.

1 Einleitung

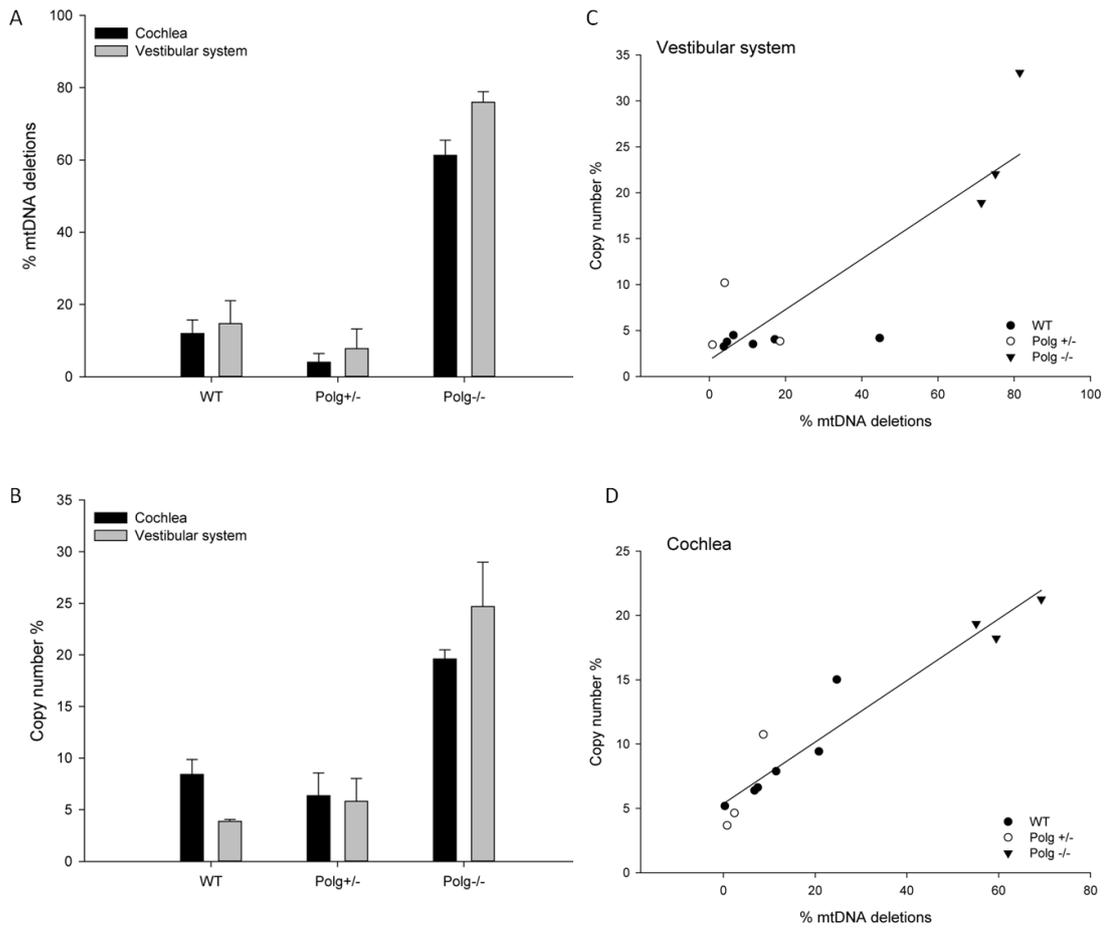


Abbildung 1-8: Zunahme der Deletionen und der Kopienzahl (Copy number) der mitochondrialen DNA (mtDNA) in der Cochlea und des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Mäuse. A. Quantifizierung der mtDNA-Deletionen durch Real-Time PCR der 13 Monate alten Wildtyp-Mäuse (WT) (n=5), heterozygoten „mtDNA-mutator“-Mäuse (Polg+/-) (n=3) und homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäuse (Polg -/-) (n=4). B. Quantifizierung der mtDNA-Kopienzahl (Copy number) durch Real-Time PCR (Mäuse wie in A). C. und D. Korrelation der mtDNA-Deletionen und der mtDNA-Kopienzahl (Copy number). Je höher der Prozentsatz der mtDNA-Deletionen, desto größer ist die Anzahl der mtDNA-Kopien (Pearson's Korrelationskoeffizient $r = 0.958$; $p = 0,000000947$) (Brosel et al., 2012).

2 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die molekularen Mechanismen der Degeneration des Vestibularsystems im Alter unter Verwendung eines Mausmodelles zu untersuchen. Dabei wird ein Mausmodell verwendet, für das in der Literatur eine cochleäre Störung auf der Basis einer mitochondrialen Dysfunktion beschrieben wurde, bisher jedoch noch keine Charakterisierung der vestibulären Funktion erfolgt ist.

Nachdem der vestibuläre Phänotyp des Mausmodelles untersucht wurde, wird eine vestibuläre Degeneration in histologischen Studien überprüft.

Folgende Fragestellungen zum Mausmodell werden in der vorliegenden Arbeit bearbeitet:

1. Gibt es histologisch nachweisbare Auffälligkeiten in den peripher-vestibulären Strukturen der „mtDNA-mutator“-Maus, welche die mitochondriale Hypothese im vestibulären Organ unterstützt?
 - Ist eine Degeneration nachweisbar? – visuelle Inspektion
 - Ist oxidativer Stress nachweisbar?
 - Ist Apoptose nachweisbar?
 - Lässt sich eine Verminderung der Atmungsketten-Komplexe nachweisen? - semiquantitative Bestimmung
2. Sind Unterschiede in der Genexpression nachweisbar und lassen sich hierdurch molekulare Mechanismen der Degeneration und Adaptierung ableiten?

Darüber hinaus erfolgt die Etablierung eines Zellkulturmodelles („Utrikel-Explants“), in welchem die therapeutischen Interventionen getestet werden.

1. Etablierung der Kultur und histologische Untersuchung
 - Strukturelle Darstellung von Zilien und dem Aktin-Zytoskelett
 - Zelltod-Assays
 - Pharmakologische Testung in Wildtyp-Mäusen und Mutanten
2. Therapeutische Intervention an „Utrikel-Explants“
 - Genexpressionsanalyse mittels Microarray
 - Bestätigung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR

3 Material und Methoden

3.1 Molekulare Veränderungen in der „mtDNA-mutator“-Maus

3.1.1 Mausstudien

Die Versuche wurden mit C57BL/6 Wildtyp-Mäusen oder mit C57BL/6 Mausmutanten mit der sogenannten Polg-D257A Mutation („mtDNA-mutator“-Mäuse) unterschiedlichen Alters durchgeführt. Die C57BL/6 Mäuse für die pharmakologischen Versuche wurden in der zentralen Tierhaltungseinrichtung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der LMU in München verpaart und gehalten. Die „mtDNA-mutator“-Mäuse wurden in der German Mouse Clinic des Helmholtz Zentrums (Neuherberg) gehalten. In beiden Einrichtungen wurden die Mäuse in isoliert belüfteten Typ II Käfigen mit Sägespänen als Einstreu bei einer Temperatur von 20 bis 24 °C, Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 %, einem 20-fachen Luftaustausch pro Stunde und 12/12 Stunden Hell-/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tierhaltung und die durchgeführten Prozeduren entsprachen den Richtlinien für Tierhaltung und den Umgang mit Tieren des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF) und der deutschen Rechtsprechung (Tierversuchsnummer der Regierung von Oberbayern 55.2-1-54-2531-88-10).

3.1.2 Versuchstiere

Tabelle 3-1: Altersverteilung zum Zeitpunkt der Versuche.

Genotyp	Tier Nr.	Geschlecht	Alter in Tagen
Wildtyp	1	w	419
	2	w	388
	3	w	382
	4	m	389
	5	m	389
Mutanten (homozygot)	6	w	400
	7	w	386
	8	w	327
	9	m	401
	10	m	380

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Felsenbeine von ca. 13 Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen verwendet. Als Kontrolle dienten ebenfalls ca. 13 Monate alte Mäuse vom Wildtyp der gleichen Linie (siehe Tabelle 3-1).

3.1.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Nach der Tötung der Mäuse wurden die Felsenbeine entnommen und sieben Tage in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Felsenbeine für zehn Tage in 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entkalkt, mit einem Wechsel des Puffers nach sieben Tagen. Danach erfolgte eine Inkubation für eine Stunde mit Magnesiumacetat-Tetrahydrat. Die Felsenbeine wurden dann in Ethanol dehydriert: 25 % Ethanol für zwei Stunden, 50 % Ethanol für zwei Stunden, 70 % Ethanol über Nacht. Es folgte eine Inkubation in Xylol. Danach wurden die Felsenbeine in Paraffin eingebettet und 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. In Tabelle 3-2 sind die Chemikalien und das Verbrauchsmaterial zur Herstellung der Paraffinschnitte aufgeführt.

Tabelle 3-2: Chemikalien und Verbrauchsmaterial zur Herstellung der Paraffinschnitte.

Verbrauchsmaterial/Geräte	Produktnummer	Hersteller
Paraformaldehyd (PFA)	8.18715.1000	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	8040.2	Carl Roth
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	M5661-250G	Sigma-Aldrich
Ethanol 100 %	A3678.1000	AppliChem
Xylol-Ersatz	A5597	Sigma-Aldrich
Objektträger	J1800AMNZ	Menzel-Gläser

3.1.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) können verschiedene Strukturen eines histologischen Gewebeschnittes angefärbt werden. Saure Moleküle werden durch Hämalan blau angefärbt, wie z. B. die DNA in Zellkernen und das raue endoplasmatische Retikulum. Basische Moleküle dagegen werden durch Eosin rot angefärbt, wie z. B. Zellplasmaproteine und Mitochondrien. Die

Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde nach Standardprotokoll durchgeführt (siehe Cardiff et al. (2014)).

3.1.5 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung wird vor allem zur Darstellung von Nervengewebe verwendet. Kresylviolett bindet an DNA und RNA und färbt somit die Nukleoli und Ribosomen violett. In Tabelle 3-3 sind die Chemikalien der Nissl-Färbung aufgeführt, das Protokoll ist Tabelle 3-4 zu entnehmen.

Tabelle 3-3: Chemikalien der Nissl-Färbung.

Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
10x PBS	P32799	Hausapotheke
Ethanol 100 %	A3678.1000	AppliChem
Xylol-Ersatz	A5597	Sigma-Aldrich
Kresylviolett (Acetat)	105235	Sigma-Aldrich
Essigsäure (Eisessig) 100 %	100056	SAFC
2-Propanol (Isopropanol)	109827	Sigma-Aldrich
Eukitt®	03989	Sigma-Aldrich
Deckgläser 24 x 50 mm	BB024050A1	Menzel-Gläser

Tabelle 3-4: Protokoll der Nissl-Färbung.

Protokoll Nissl	
1.	Deparaffinieren: Xylol-Ersatz 2 x 10 min 100 %, 100 %, 80 %, 70 % Ethanol je 5 min
2.	70 % Ethanol bei 40 °C über Nacht
3.	2 x Abwaschen mit ddH ₂ O
4.	Kresylviolett 25 min
5.	Abwaschen mit ddH ₂ O
6.	96 % Ethanol 2 min
7.	100 % Ethanol + 8 Tropfen Eisessig 2 min
8.	100 % Ethanol 2 min
9.	unter Mikroskop überprüfen
10.	3 x 5 min 100 % Propanol
11.	2 x 5 min Xylen
12.	Eindeckeln mit Eukitt®

3.1.6 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG)-Färbung

8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) ist ein Nukleosid, welches bei erhöhtem oxidativem Stress nachgewiesen werden kann. Die verwendeten Chemikalien

3 Material und Methoden

für die Färbung sind Tabelle 3-5 zu entnehmen. Das Protokoll ist in Tabelle 3-6 dargestellt.

Tabelle 3-5: Chemikalien der 8-OHdG-Färbung.

Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
10x PBS	P32799	Hausapotheke
Ethanol 100 %	A3678.1000	AppliChem
Xylol-Ersatz	A5597	Sigma-Aldrich
Methanol	1.06009.2511	Merck
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	8.22287.1000	Merck
Mouse on Mouse	MKB-2213	Vector Labs
Erster Antikörper: Anti-8-Hydroxy-2'- deoxyguanosine Antikörper	AB48508	Abcam
Tween [®] 20 (Polysorbat)	P2287	Sigma-Aldrich
BSA, purified, 100x	B90015	New England Biolabs
IHC Select DAB Kit mit zwei- tem Antikörper und Streptavi- din	DAB150	Millipore
Diaminobenzidin (DAB)	K3468	DAKO
Methylgrün	115944	Sigma-Aldrich

Tabelle 3-6: Protokoll der 8-OHdG-Färbung.

Protokoll 8OHdG	
1.	Deparaffinieren: Xylol-Ersatz 2 x 10 min 100 %, 100 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol je 5 min
2.	Zelleigene Peroxidase blocken: 75 µl Methanol + 15 µl H ₂ O ₂ (30 %) für 40 min
3.	2 x 5 min waschen mit 1x PBS
4.	Blocken mit Mouse on Mouse 1:25 in 1x PBS für 1 Stunde (50 µl pro Schnitt)
5.	5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween [®] 20
6.	Erster Antikörper 1:400 in 1x PBS + 1 % BSA für 1 Stunde bei Raum- temperatur (RT)
7.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween [®] 20
8.	Zweiter Antikörper 30 min bei RT (1 Tropfen pro Schnitt)
9.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween [®] 20
10.	Streptavidin 30 min bei RT (1 Tropfen pro Schnitt)
11.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween20
12.	DAB 1,5 min (1 Tropfen pro Schnitt)
13.	Abwaschen mit ddH ₂ O
14.	Methylgrün für 10 Sekunden
15.	Abwaschen mit ddH ₂ O
16.	Eindeckeln mit Kaisers Glycerin

3.1.7 TUNEL-Assay

Mit dem TUNEL-Assay („TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“) können die Zellkerne apoptotischer Zellen dargestellt werden. Durch die Aktivität von Endonukleasen wird der DNA-Strang des Zellkerns während der Apoptose fragmentiert. An den Bruchenden werden dadurch Hydroxygruppen (3'-OH-Gruppen) frei, welche durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) mit markierten Nukleotiden, biotinylierte Desoxyuridintriphosphate (dUTPs), versehen werden. Diese können mit Hilfe der Streptavidin-konjugierten Peroxidase (Streptavidin-HRP) angefärbt werden. Zur Kontrolle des Assays wird eine Negativkontrolle ohne das Enzym TdT und eine Positivkontrolle, welche mit DNase vorbehandelt wird, mitgeführt. Da nicht in jedem Schnitt des Felsenbeins mindestens eine Ampulle, der Sacculus und der Utrikel enthalten ist, wurden pro Maus jeweils drei Schnitte des Felsenbeins angefärbt. Somit wurde gewährleistet, dass alle drei Strukturen mit der Färbung beurteilt werden können (n = 5). Das verwendete Kit und die benötigten Chemikalien für den TUNEL-Assay sind in Tabelle 3-7 aufgeführt. Das Protokoll kann Tabelle 3-8 entnommen werden.

Tabelle 3-7: Kit und Chemikalien des TUNEL-Assays.

Kit/Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	G7130	Promega
Paraformaldehyd (PFA)	8.18715.1000	Merck
10x PBS	P32799	Hausapotheke
Ethanol 100 %	A3678.1000	AppliChem
Xylol-Ersatz	A5597	Sigma-Aldrich
RNase-Free DNase Set: DNase I und RDD Puffer	79258	Quiagen
Methanol	1.06009.2511	Merck
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	8.22287.1000	Merck
Kaisers Glyceringelatine	1.09242.0100	Merck
Deckgläser 24 x 50 mm	BB024050A1	Menzel-Gläser

Tabelle 3-8: Protokoll des TUNEL-Assays.

Protokoll TUNEL Assay	
1.	Deparaffinieren: Xylol-Ersatz 2 x 10 min 100 %, 100 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol je 5 min
2.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS
3.	Fixieren 4 % PFA 5 min
4.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS
5.	Proteinase K 20 µg/ml (100 µl/Objektträger)
6.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS
7.	Fixieren 4 % PFA 5 min
8.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS
9.	Negativkontrolle und TUNEL bleiben in PBS Positivkontrolle: 1. RDD Puffer 5 min 2. 2,5 µl RDD Puffer 0,625 µl DNase I 21,875 µl H ₂ O } 25 µl pro Schnitt für 10 min
10.	3 x 2 min waschen mit ddH ₂ O
11.	5 min waschen mit 1x PBS
12.	Äquilibrationspuffer 10 min
13.	Positivkontrolle und TUNEL: 98 µl Äquilibrationspuffer 1 µ Biotin-Nukleotid-Mix 1 µ rTdT } 50 µl pro Schnitt 60 min 37 °C Negativkontrolle: 49 µl Äquilibrationspuffer 0,5 µl Biotin-Nukleotid-Mix 0,5 µl H ₂ O } 50 µl pro Schnitt 60 min 37 °C
14.	2 x 15 min SSC (Saline-Sodium Citrate)
15.	3 x 5 min 1x PBS
16.	Zelleigene Peroxidase blocken: 9667 µl Methanol + 333 µl H ₂ O ₂ (30 %) für 10 min
17.	3 x 5 min 1x PBS
18.	Streptavidin-HRP 1:300 in 1x PBS 30 min 150 µl pro Objektträger
19.	DAB (1 Tropfen/ml → 500 µl pro Objektträger)
20.	Abwaschen mit ddH ₂ O
21.	Eindeckeln mit Kaisers Glyzerin

3.1.8 Immunhistochemische Färbung der Atmungskettenkomplexe

Wie in Kapitel 1.4.2 dargestellt, sind die verschiedenen Komplexe der Atmungskette sowohl nukleär als auch mitochondrial kodiert. Der Komplex IV ist zu ca. 23 %, der Komplex I zu 15 % mitochondrial kodiert. Die Aktivität beider Komplexe kann daher bei Mutationen der mtDNA gestört sein. Der Komplex II

ist dagegen rein nukleär kodiert und mtDNA-Mutationen haben keine Auswirkung auf die Funktion. Mittels Antikörpermarkierung können die Atmungskettenkomplexe semiquantitativ dargestellt werden. Es ist gut belegt, dass im Falle von Mutationen die Komplexe quantitativ reduziert sind. Die verwendeten Antikörper wurden in der Literatur bereits beschrieben (Grunewald et al., 2014). In Tabelle 3-9 sind die verwendeten Antikörper der immunhistochemischen Färbung der Atmungskettenkomplexe dargestellt. Tabelle 3-10 zeigt die verwendeten Chemikalien und Geräte für die Färbung. Die Färbung wurde nach dem Protokoll in Tabelle 3-11 durchgeführt.

Tabelle 3-9: Verwendete Antikörper der immunhistochemischen Färbung der Atmungskettenkomplexe.

Antikörper/Kit	Verdünnung	Produktnummer	Hersteller
Erster Antikörper: Komplex I NDUFB8	1:300	MS 105	MitoSciences
Erster Antikörper: Komplex II 70 kDa	1:2000	MS 204	MitoSciences
Erster Antikörper: Komplex IV Subunit 1	1:1000	MS 404	MitoSciences
IHC Select DAB 150 Kit mit zweitem Antikörper und Streptavidin		DAB150	Millipore
Diaminobenzidin (DAB)		K3468	DAKO

Tabelle 3-10: Chemikalien und Gerät für die immunhistochemische Färbung der Atmungskettenkomplexe.

Chemikalien/Gerät	Produktnummer	Hersteller
Xylol-Ersatz	A5597	Sigma-Aldrich
Methanol	1.06009.2511	Merck
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	8.22287.1000	Merck
10x PBS	P32799	Hausapotheke
Citronensäure 10 mM	8.18707.100	Merck
Triton-X-100	807426	ICN Biochemicals
Mouse on Mouse	MKB-2213	Vector Labs
Tween® 20	P2287	Sigma-Aldrich
BSA, purified, 100x	B90015	New England Biolabs
Eukitt®	03989	Sigma-Aldrich
Deckgläser 24 x 50 mm	BB024050A1	Menzel-Gläser
Dampfkocher	AD634	Adler

Tabelle 3-11: Protokoll der immunhistochemischen Färbung der Atmungskettenkomplexe.

Protokoll der immunhistochemischen Färbung der Atmungskettenkomplexe	
1.	Deparaffinieren: Xylol-Ersatz 2 x 10 min 100 %, 100 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol je 5 min
2.	Zelleigene Peroxidase blocken: 75 ml Methanol + 15 ml H ₂ O ₂ (30 %) für 40 min
3.	2 x 5 min waschen mit 1x PBS
4.	Antigendemaskierung: 45 min Citratpuffer 10 mM pH 6 im Dampfkocher
5.	Objektträger abkühlen
6.	Permeabilisieren mit 1x PBS + 0,4 % Triton-X für 20 min (300 µl pro Objektträger)
7.	Blocken mit Mouse on Mouse 1:25 in 1x PBS für 1 Stunde (50 µl pro Schnitt)
8.	1 x 5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween [®] 20
9.	Erste Antikörper in 1x PBS + 1 % BSA bei 4 °C über Nacht
10.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween [®] 20
11.	Zweiter Antikörper 1 Stunde bei RT (1 Tropfen pro Schnitt)
12.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween [®] 20
13.	Streptavidin 1 Tropfen pro Objektträger 1 Stunde bei RT
14.	3 x 5 min waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween [®] 20
15.	DAB (Diaminobenzidin) 1 Tropfen pro 1 ml Komplex I: 2 min Komplex II: 2 min Komplex IV: 1 min
16.	Abwaschen mit ddH ₂ O
17.	Dehydrieren: 50 %, 70 %, 80 %, 100 %, 100 % Ethanol, Xylol, Xylol je 2 min
18.	Eindeckeln mit Eukitt [®]

3.1.9 Auswertung der histologischen Färbungen

Generieren digitaler Aufnahmen

Für die Aufnahme digitaler Bilder der HE-, Nissl-, 8-OHdG-Färbung, des TUNEL-Assays und der immunhistochemischen Färbung der Atmungskettenkomplexe wurde ein OLYMPUS BX60F5 Mikroskop verwendet. Dieses war mit einer AxioCam HR Color von Zeiss und dem zugehörigen Programm Axio Vision Rel. 4.8 ausgestattet. Zunächst wurde unter zehnfacher Vergrößerung der vestibuläre Teil des Innenohres aufgesucht, dann 40-fach vergrößert und jeweils der Sacculus, der Utriculus und die Ampulle gänzlich abfotografiert. Die Aufnahmen

der jeweiligen Färbung wurden vollständig an einem Tag durchgeführt, um die Einstellungen des Mikroskops und der Software konstant zu halten. Die Färbungen wurden jeweils an entsprechenden Schnitten von Wildtyp-Mäusen (n = 5) und „mtDNA-mutator“-Mäusen (n = 5) durchgeführt.

Auswertung TUNEL-Assay

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit ImageJ 1.45 (Wayne Rasband). Zuerst wurde die Fläche der Struktur gemessen. Die apoptotischen Zellen wurden gezählt und ins Verhältnis zur Fläche gesetzt. Somit konnte ein Vergleich zwischen den Wildtyp- (n = 5) und den „mtDNA-mutator“-Mäusen (n = 5) erfolgen. Zur Überprüfung der Signifikanz der Daten wurde ein t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt.

Semi-quantitative Auswertung der Atmungskettenkomplexe

Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ 1.45 (Wayne Rasband) wurde eine Intensitätsmessung der Komplexfärbung vorgenommen. Dazu wurde das farbige Bild in ein 8-bit Bild mit 256 Graustufen konvertiert. In jeder zu messender Struktur (Sacculus, Utriculus) wurden 20 Haarzellen ausgewählt und je ein Histogramm erstellt. Dabei wird jedem Pixel eines Bildes ein entsprechender Wert zwischen 0 - 255 zugeordnet. Durch den Mittelwert der Grauwerte ist ein Vergleich der Intensität der Färbung möglich. Dies wurde für die Färbung der Komplexe I, II und IV durchgeführt. Um eventuelle technisch bedingte Unterschiede der Färbung zu beseitigen, wurden die Werte der Färbung des Komplexes I oder IV ins Verhältnis zu den Werten der Färbung des Komplexes II gesetzt. Da sich dieselben Zellen in den alternierenden Schnitten nicht wiederfanden, wurde der Mittelwert des Komplex II als Referenz für den Wert einer Zelle des Komplex I oder IV herangezogen. Der Quotient lautete also wie folgt:

$$\frac{\text{Komplex I oder IV Wert 1 Zelle}}{\text{Komplex II Mittelwert 20 Zellen}}$$

Zur Überprüfung der Signifikanz der Daten wurde ein t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt.

3.2 Etablierung eines In-vitro-Modells und Testung der pharmakologischen Intervention

3.2.1 Präparation der Maus

Die Experimente wurden mit C57BL/6 Mäusen im Alter von zehn bis 14 Tagen durchgeführt. Die Mäuse wurden mit Kohlenstoffdioxid anästhesiert und anschließend dekapitiert. Am Kopf wurde die Epidermis entfernt, der Schädel wurde entlang der Sutura sagittalis superior eröffnet und die Hirnhälften entfernt, wodurch die Schädelbasis freigelegt wurde (siehe Abbildung 3-1A). Die weitere Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop mit Lichtquelle. Das Felsenbein wurde bei 6,4-facher Vergrößerung mit einer Pinzette herausgelöst, von Muskel- und anderem Weichteilgewebe getrennt und in eine Petrischale mit phosphatgepufferter Salzlösung („phosphate buffered saline“, PBS) überführt (siehe Abbildung 3-1B). Die Cochlea wurde entfernt und der Utrikel durch Wegbrechen der knöchernen Wand mit einer Pinzette freigelegt und herausgelöst (siehe Abbildung 3-1C, D). Der Utrikel wurde entweder auf eine ca. 1,5 mm² große Filtermembran platziert oder auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas gelegt, welches für Färbungen besser geeignet ist. Die Filtermembran oder das Deckglas wurde dann auf ein Metallgitter in eine 6-Well Platte mit Zellkulturmedium verbracht (siehe Abbildung 3-1E). Die Inkubation der Utrikel erfolgte bei 37 °C mit 5 % CO₂ für ein bis drei Tage bis zur weiteren Verwendung. In Tabelle 3-12 sind die Verbrauchsmaterialien und Geräte zur Präparation der Mäuse aufgeführt. Tabelle 3-13 zeigt die Zusammensetzung des Zellkulturmediums. Das Protokoll zur Beschichtung der Deckgläser ist Tabelle 3-14 zu entnehmen.

3 Material und Methoden

Tabelle 3-12: Verbrauchsmaterial und Geräte der Mausexplantation.

Verbrauchsmaterial/Gerät	Produktnummer	Hersteller
Stereomikroskop	WILD M3C	Leica
Lichtquelle	KL 1500	Leica
10x PBS	P32799	Hausapotheke
Zellkulturschalen, Ø 58 mm, CC, Deckel, steril	150288	Nunc/Wagner&Munz
6-Well Zellkulturplatte, steril, mit Deckel	657160	Cellstar
Siebgewebe Edelstahl Ø-0,22xMw-0,5, Material Edelstahl 1.4301	43108	Riffert Metallwaren
Membrane filters Nuclepore track-etched, pore size 0.1µ, circle 25mm	515-2028	VWR
Deckgläser, 12 mm Ø	01 155 20	Marienfeld GmbH&Co.KG
Poly-L-Lysin Lösung 0,01 %	P4832	Sigma-Aldrich
Ethanol 100 %	A3678.1000	AppliChem
Objektträger	J1800AMNZ	Menzel-Gläser

Tabelle 3-13: Zusammensetzung des Zellkulturmediums für die Utrikel.

Zellkulturmedium	Konzentration	Produktnummer	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)		21331020	Invitrogen
Fetal bovine serum (FBS)	10 %	10270-106	Invitrogen
L-Glutamin	2 mM	G3126	Sigma-Aldrich
Penicillin	100 U/ml	P7794	Sigma-Aldrich

Tabelle 3-14: Beschichtung der Deckgläser.

Beschichtung der Deckgläser	
1.	Deckgläser 20 min in 70 % Ethanol legen
2.	In der Flamme trocknen
3.	Über Nacht in 0,01 % Poly-L-Lysin Lösung einlegen
4.	Trocknen lassen

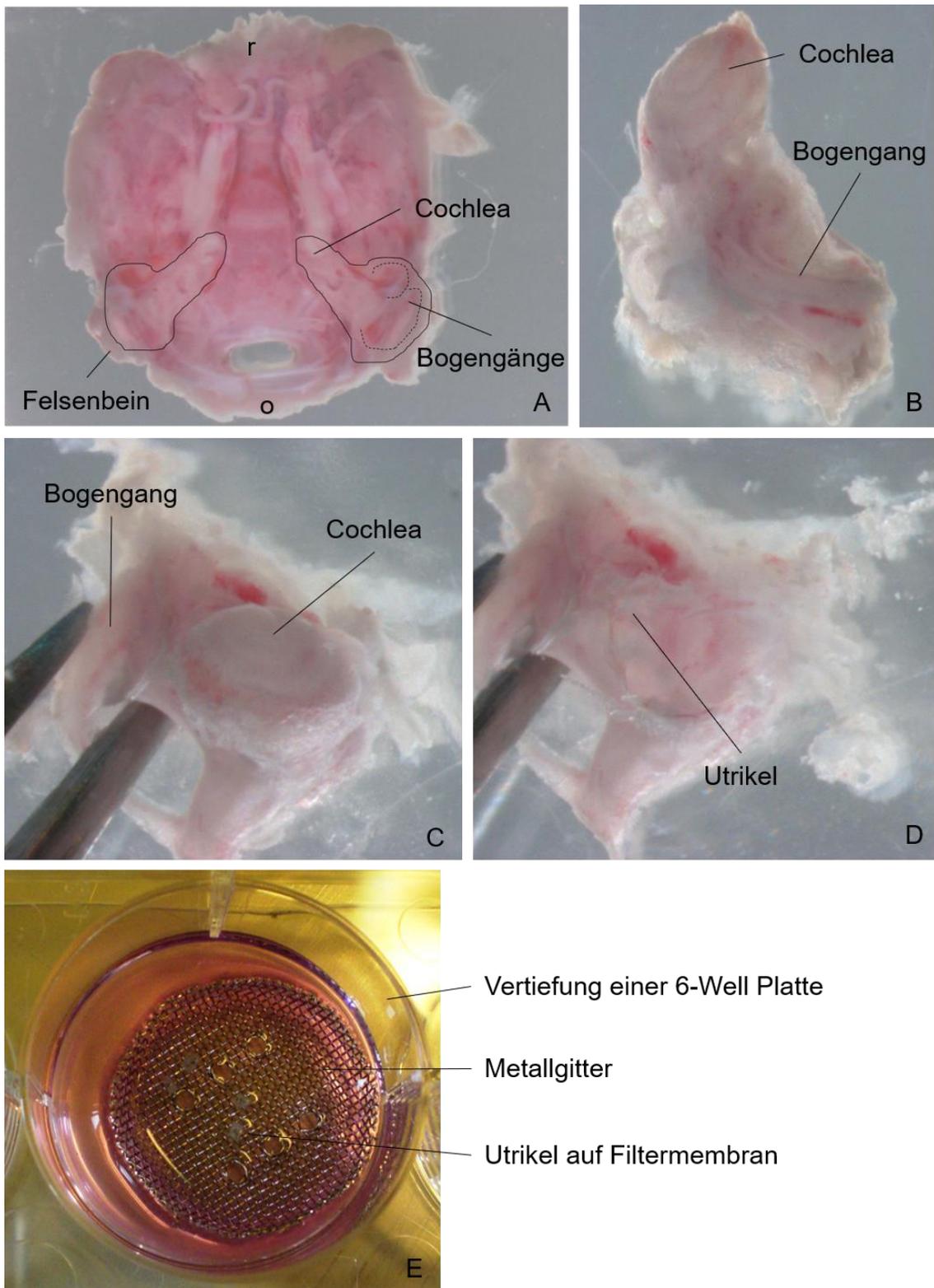


Abbildung 3-1: Präparation des Utrikels. A. Schädelbasis in Sicht von oben, die Lage des Felsenbeins ist eingezeichnet, r = rostral, o = occipital. B. Felsenbein nach Entnahme aus der Schädelbasis. C. Felsenbein in Ansicht von oben vor Präparation. D. Felsenbein in Ansicht von oben nach Entfernung der Cochlea, Sicht auf den Utrikel. E. Kultivierung der Utrikel auf Filtermembran in einer 6-Well Platte mit Metallgitter.

3.2.2 Behandlung der Utrikel

Nach vier bis 24 Stunden im Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂ wurde das Medium gewechselt und neues Medium (siehe Tabelle 3-13), versetzt mit AICAR oder Bezafibrat, für 72 Stunden hinzugegeben. Tabelle 3-15 zeigt die verwendeten Chemikalien und Geräte zur Behandlung der Utrikel.

Tabelle 3-15: Chemikalien und Geräte zur Behandlung der Utrikel.

Chemikalie/Gerät	Produktnummer	Hersteller
AICAR	A9978-25MG	Sigma-Aldrich
Bezafibrat	B7273-1G	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.1	Carl Roth
RNase/DNase freies H ₂ O	W4502	Sigma-Aldrich
Feinwaage	GX-400	A & D
Vortexer (Vortex Genie 2)	G560E	Scientific Industries

3.2.3 Fluoreszenzfärbung

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bindet selektiv an DNA und ermöglicht somit die Darstellung der Zellkerne der Haar- und Stützzellen der Utrikel. Somit konnten die Utrikel im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Die Verbrauchsmaterialien und Chemikalien der DAPI-Färbung sind Tabelle 3-16 zu entnehmen. Das Protokoll der Färbung zeigt Tabelle 3-17.

Tabelle 3-16: Verbrauchsmaterial und Chemikalien der Färbung mit DAPI.

Verbrauchsmaterial/Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
Paraformaldehyd (PFA)	8.18715.1000	Merck
10x PBS	P32799	Hausapotheke
Objektträger	J1800AMNZ	Menzel-Gläser
DAPI Fluoromount-G	0100-20	Southern Biotech
Porzellan Färbepalette	E71562-01	Science Services

Tabelle 3-17: Protokoll der DAPI-Färbung.

DAPI-Färbung	
1.	3 x 5 min in 1x PBS waschen
2.	10 min in 3,7 % PFA fixieren
3.	3 x 5 min in 1x PBS waschen
4.	15 min bei 37 °C in DAPI-Methanol-Lösung 1 µg/ml
5.	3 x 2 min in 1x PBS waschen
6.	In PBS belassen

Phalloidin

Nach drei bis 72 Stunden im Inkubator wurde die Färbung der Utrikel mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin durchgeführt. Phalloidin ist das Toxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amantia phalloides*) und eines von sieben bekannten natürlich vorkommenden Phallotoxinen, deren Grundgerüst aus sieben zyklisch angeordneten Aminosäuren besteht. Es bindet irreversibel an F-Actin und kann dadurch genutzt werden, um die Verteilung von F-Actin in der Zelle sichtbar zu machen. Bei der Färbung der Utrikel wurden durch das Phalloidin das Aktinskelett und die Stereozilien der Haarzellen angefärbt, wodurch eine Quantifizierung möglich wurde. Die Verbrauchsmaterialien und Chemikalien der Phalloidin-Färbung sind Tabelle 3-18 zu entnehmen. Tabelle 3-19 zeigt das Protokoll der Färbung.

Tabelle 3-18: Verbrauchsmaterial und Chemikalien der Phalloidin-Färbung.

Verbrauchsmaterial/Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
Paraformaldehyd (PFA)	8.18715.1000	Merck
10x PBS	P32799	Hausapotheke
Triton-X-100	807426	ICN Biochemicals
Tween® 20	P2287	Sigma-Aldrich
Rabbit Serum	R9133-5ml	Sigma-Aldrich
Phalloidin – Tetramethylrhodamine B isothiocyanate	P1951	Sigma-Aldrich
Objektträger	J1800AMNZ	Menzel-Gläser
VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium	VEC-H-1400	Biozol
Deckgläser 24 x 32 mm	BB024032A1	Menzel-Gläser
Porzellan Färbepalette	E71562-01	Science Services

Tabelle 3-19: Protokoll der Phalloidin-Färbung.

Phalloidin-Färbung	
1.	3 x 5 min in 1x PBS waschen
2.	10 min in 3,7 % PFA fixieren
3.	3 x 5 min in 1x PBS waschen
4.	20 min mit 1x PBS + 0,1 % Triton-X-100 permeabilisieren
5.	3 x 5 min in 1x PBS waschen
6.	1 Stunde mit 5 % Rabbit Serum in 1x PBS blocken
7.	1 x 1 min waschen
8.	40 min mit 30 µg/ml fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gelöst in 1x PBS mit 1 % Rabbit Serum bei RT inkubieren (lichtgeschützt)
9.	3 x 5 min in 1x PBS + 0,1 % Tween® 20 waschen
10.	auf Objektträger überführen und eindeckeln mit VECTASHIELD®

Generieren digitaler Aufnahmen

Die Mikroskopie der mit DAPI angefärbten Utrikel wurde mit einem Zweiphotonenmikroskop durchgeführt. Hierfür wurde das Leica SP8 MP-Mikroskop, ausgestattet mit einem gepulsten InSight DS+ Laser, des Biomedizinischen Zentrums der LMU München sowie der zugehörigen Software verwendet.

Für die Phalloidininfärbung wurde das Mikroskop BZ 8100E von Keyence mit integrierter Kamera verwendet. Es wurde je ein Übersichtsbild des Utrikels in fünffacher Vergrößerung, sowie mehrere Aufnahmen in zwanzigfacher Vergrößerung erstellt. Dazu wurde der Filter für rote Fluoreszenz verwendet. Die Aufnahmen erfolgten als Z-Stapel und wurden anschließend mit dem Programm BZ Analyzer zu einem Bild verarbeitet.

3.2.4 LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity-Assay

Der LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity-Assay dient der Diskriminierung „lebender“ von „toten“ Zellen in Zellkulturen oder Kulturpräparaten. Die Messung beruht auf der enzymatischen Umsetzung durch intrazelluläre Esterasen von Calcein-AM zu Calcein, welches grün fluoresziert. In Zellen mit beschädigter Zellmembran kann hingegen Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) eindringen, wodurch abgestorbene Zellen rot fluoreszieren. Tabelle 3-20 zeigt die verwendeten Chemikalien und Geräte des LIVE/DEAD®-Assays. Das Protokoll ist Tabelle 3-21 zu entnehmen.

Tabelle 3-20: Chemikalien und Geräte des LIVE/DEAD®-Assays.

Chemikalien	Produktnummer	Hersteller
10x PBS	P32799	Hausapotheke
LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity-Kit	L3224	Invitrogen
Objektträger	J1800AMNZ	Menzel-Gläser
VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium	VEC-H-1400	Biozol
Deckgläser 24 x 32 mm	BB024032A1	Menzel-Gläser
Porzellan Färbepalette	E71562-01	Science Services

Tabelle 3-21: Protokoll LIVE/DEAD®-Assays.

LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity-Assay	
1.	1 µl der 2 mM EthD-1 Stammlösung zu 1 ml sterilem 1x PBS geben
2.	0,5 µl der 4 mM Calcein-AM Stammlösung dazu geben
3.	Vortexen
4.	Utrikel 2 x mit 1x PBS waschen
5.	Ca. 200 µl auf den Utrikel geben
6.	30 - 45 min mit Deckel im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
7.	Utrikel 2 x mit 1x PBS waschen
8.	Utrikel auf Objektträger legen und eindeckeln mit VECTASHIELD®

Generieren digitaler Aufnahmen

Mit dem Mikroskop BZ 8100E von Keyence wurde je ein Übersichtsbild des Utrikels in fünffacher Vergrößerung, sowie mehrere Aufnahmen in zwanzigfacher Vergrößerung erstellt. Dazu wurde der Filter für rote Fluoreszenz, sowie der Filter für grüne Fluoreszenz verwendet. Die Aufnahmen erfolgten als Z-Stapel und wurden anschließend mit dem Programm BZ Analyzer zu einem Bild verarbeitet. Abschließend wurden die Bilder überlagert, sodass die rote und grüne Fluoreszenz auf einem Bild sichtbar ist.

Grafische Auswertung

Um Werte über die Anzahl der abgestorbenen und der intakten Zellen zu erhalten, erfolgte eine grafische Auswertung der Färbung. Es wurden Utrikel, welche sich für drei Stunden in Kultur befanden (n = 4), mit Utrikeln, welche sich für 72 Stunden in Kultur befanden (n = 4), verglichen. Zudem erfolgte eine Gegenüberstellung von Utrikeln, welche für 72 Stunden mit AICAR behandelt wurden (n =4), im Vergleich zu unbehandelten Utrikeln, welche sich für 72 Stunden in Kultur befanden. Da es technisch nicht möglich war, die einzelnen roten oder grünen Zellen zu zählen, wurde der prozentuale Anteil der rot gefärbten Zellen in einem Bildausschnitt mit Hilfe des Programms GIMP 2.8 gemessen. Dazu wurde ein einheitlicher Schwellenwert festgelegt und somit die Fläche in Prozent oberhalb des Schwellenwertes gemessen. Zur Überprüfung der Signifikanz der Daten wurde ein t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt.

3.2.5 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA für den Microarray wurde das AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Quiagen) verwendet. Es wurde während des gesamten Arbeitsablaufes unter

RNAse freien Bedingungen gearbeitet. Die RNA wurde nach Angaben des Herstellers extrahiert. Dabei wurden die Proben zunächst in einem denaturierenden Puffer lysiert und homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat auf eine Säule gegeben, wodurch die RNA gebunden wurde. Diese Säule wurde mehrmals gewaschen und danach die RNA mit DNase/RNase freiem Wasser eluiert. Abweichend zum Protokoll wurde die RNA mit 18 µl DNase/RNase freiem Wasser eluiert. Tabelle 3-22 sind die Verbrauchsmaterialien und Geräte der RNA-Isolierung zu entnehmen.

Tabelle 3-22: Verbrauchsmaterial und Geräte der RNA-Isolierung für den Microarray.

Verbrauchsmaterial/Geräte	Produktnummer	Hersteller
AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50)	80204	Quiagen
Ethanol 100 %	A3678.1000	AppliChem
2-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth
Zentrifuge 5415D	5425 26845	Eppendorf
Vortexer (Vortex Genie 2)	G560E	Scientific Industries

3.2.6 Bioanalyser

Qualität und Quantität der isolierten RNA aus den Utrikeln wurde vor der Verwendung im Microarray mit dem Bioanalyser gemessen. Der Agilent 2100 Bioanalyser beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung und Registrierung des Fluoreszenz-Signals der RNA. Das „Maß“ der RNA-Qualität ist die sogenannte RNA Integrity Number (RIN). Diese wird von der Software auf Grundlage des Elektropherogramms errechnet. Eine RIN von zehn steht für vollkommen intakte RNA, eine RIN von drei dagegen bedeutet, dass die RNA stark degradiert ist.

Bei RNA von guter Qualität erhält man ein Elektropherogramm und ein „Gel-like Image“, wobei sich die 18S und 28S Untereinheiten ribosomaler RNA als zwei unterscheidbare Banden darstellen. Zu jeder Probe wird zusätzlich ein früherer Marker hinzugefügt, um die Proben auszurichten und besser vergleichen zu können (siehe Abbildung 3-2). Eine Degradierung der RNA durch eine Kontamination mit RNasen führt zu einer Verschiebung der RNA-Größenverteilung zu kleineren Fragmenten und einer Verringerung der Signalintensität. Die 18S und 28S Banden können dann nicht mehr mit Sicherheit identifiziert werden (Kuschel et al., 2002).

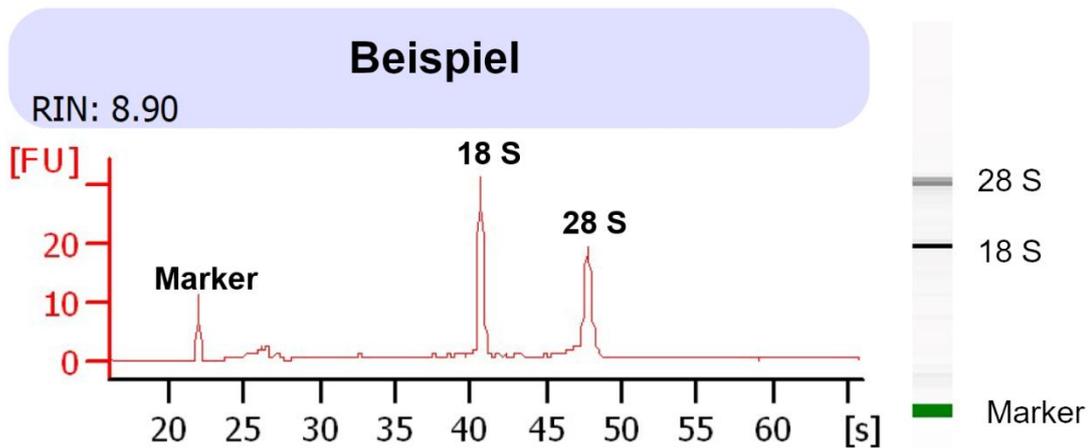


Abbildung 3-2: Elektropherogramm und „Single Lane Gel-Like Image“ des Bioanalyzers bei RNA von guter Qualität.

Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurde das RNA 6000 Pico Kit verwendet. Dieses Kit dient zur Analyse von RNA-Konzentrationen zwischen 1 ng/ μ l und 200 pg/ μ l. Als Ergebnis der Analyse erhält man außerdem die Konzentration der RNA-Proben. In Tabelle 3-23 sind die Geräte und Materialien zur Analyse der RNA aufgeführt.

Tabelle 3-23: Verbrauchsmaterial und Gerät zur Analyse der RNA.

Verbrauchsmaterial/Gerät	Produktnummer	Hersteller
2100 Bioanalyser	G2938C	Agilent
2100 Expert Software	G2949CA	Agilent
RNA 600 Pico Kit	5067-1513	Agilent

3.2.7 Microarray

Microarrays machen die parallele Analyse von mehreren tausend Genen auf einem miniaturisierten Chip möglich. Das Analyseverfahren wurde gegen Ende der 1980er Jahre von Stephen P. A. Fodor entwickelt (Fodor et al., 1991), der erste kommerziell erhältliche Chip wurde 1994 von Affymetrix auf den Markt gebracht. Heute können weit mehr als 100.000 Gensequenzen aus sämtlichen Geweben identifiziert werden und es ist möglich, eine Auskunft über die Expression des entsprechenden Gens in einer Gewebeprobe zu geben.

Die zu analysierende RNA wird im Vorfeld mittels In-vitro-Transkription (IVT) amplifiziert. Hierbei werden mit einer reversen Transkriptase Kopien der RNA, sogenannte komplementäre DNA („complementary DNA“, cDNA) erstellt, die nachfolgend wiederum transkribiert werden. Die dadurch entstehende Antisen-

se-RNA (aRNA) wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert („Labeling“) und anschließend auf Chips aufgebracht, welche etwa ein Quadratzentimeter große Glas- oder Nylonsubstrate sind. Die einzelnen Felder auf dem Microarray sind dabei mit unterschiedlichen Fragmenten aus einzelsträngiger, fluoreszenzmarkierter DNA oder RNA beschichtet. Liegt eine zu der auf dem Microarray komplementäre Nukleinsäuresequenz vor, kommt es zur Bindung der Probe an das Substrat (Hybridisierung). Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal kann mit Hilfe einer hochauflösenden Laserkamera auf ihre Position, Wellenlänge und Intensität detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip Kit von Illumina verwendet (siehe Tabelle 3-24). Dieser Microarray-Chip ermöglicht die Expressionsanalyse des gesamten Maus-Genoms mit 45.281 Transkripten. Die Sequenzen der Proben des Chips sind abgeleitet von der „National Center for Biotechnology Information Reference Sequence“ (NCBI RefSeq) Datenbank (Build 36, Release 22), ergänzt mit Proben abgeleitet von dem „Mouse Exonic Evidence Based Oligonucleotide“ (MEEBO) Set sowie auch exemplarische proteinkodierende Sequenzen, welche in der RIKEN FANTOM2 Datenbasis kartiert sind.

Durchführung des Microarrays

Es erfolgte die Isolierung der RNA und die anschließende Überprüfung der Qualität wie in Kapitel 3.2.5 und 3.2.6 beschrieben. Die Vorbereitung der Proben mit Hilfe der In-vitro-Transkription wurde zunächst mit dem Ambion MessageAmp II aRNA Amplification Kit (siehe Tabelle 3-24) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Für die zweite Transkriptionsreaktion wurde das Illumina Total-Prep RNA Amplification Kit (siehe Tabelle 3-24) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die amplifizierte aRNA wurde unmittelbar im Anschluss für die Hybridisierung verwendet.

Tabelle 3-24: Material zur Durchführung des Microarrays.

Verbrauchsmaterial/Geräte	Produktnummer	Hersteller
MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip Kit (36 Samples)	BD-201-0602	Illumina
MessageAmp II aRNA Amplification Kit 20RXN	AM1751	Invitrogen
Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit	AMIL1791	Invitrogen
T7-Oligo(DT) Primer	AM5712	Invitrogen
SUPERaseIn	AM2694	Invitrogen
Ingenuity Pathway Analysis (IPA)		Ingenuity Systems, Qiagen

Utrikel

Die explantierten Utrikel der zehn bis 14 Tage alten Wildtyp-Mäuse wurden für 72 Stunden mit 300 μ M AICAR ($n = 5$) oder 500 μ M Bezafibrat ($n = 5$) behandelt. Zur Kontrolle wurden Utrikel verwendet, welche sich über 72 Stunden ohne Behandlung in Kultur befanden ($n = 5$).

Zudem wurden Utrikel von ca. fünf Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen verwendet und für 72 Stunden mit 300 μ M AICAR ($n = 4$) behandelt. Als Kontrolle dienten Utrikel von gleichaltrigen „mtDNA-mutator“-Mäusen, welche sich über 72 Stunden ohne Behandlung in Kultur befanden ($n = 4$).

Statistische Analyse

Die Mikroarray-Rohdaten wurden aus dem Programm „Illumina Beadstudio“ in R (<http://cran.r-project.org>) exportiert, log-transformiert (\log_2) und normalisiert (non-lineare transformation mittels „LOESS smoothing“). Die signifikant regulierten Transkripte wurden über ein transkriptomweites, differentielles t-Test-Screening identifiziert. Es wurde eine Bonferroni-Korrektur angewendet. Hierbei wird der p-Werts des Gens mit der Anzahl der insgesamt untersuchten Gene multipliziert. Wenn diese überaus stringente Korrektur keine signifikanten Ergebnisse ergab, wurde eine Testung nach Benjamini & Hochberg (Benjamini-Hochberg-Prozedur) mit einer Falscherkennungsrate von $< 0,05$ (5 %) durchgeführt.

Signalweg-Analyse

Mittels einer Signalweg-Analyse können einzelne Genen Signalwegen zugeordnet werden. Dadurch erschließen sich Zusammenhänge zwischen Genen

und mögliche Funktionen von Proteinen. Die weitere Auswertung der im Microarray differentiell regulierten Gene und statistische Überprüfung der Zusammenhänge wurde mittels „Ingenuity Pathway Analysis“ (IPA) von Qiagen durchgeführt. IPA ist eine webbasierte Softwareanwendung für die Analyse, Integration und Interpretation von Microarray-Daten. Die Datenanalyse und -interpretation mit IPA baut auf dem Inhalt der „Ingenuity Knowledge Base“ auf. Über Algorithmen werden Regulatoren, Beziehungen und Pfade identifiziert, die für die in einem analysierten Datensatz beobachteten Änderungen relevant sind. Das Programm bietet die Möglichkeit einer Signalweganalyse, mit welcher die im Microarray differentiell regulierten Gene „unvoreingenommen“ und hypothesenfrei analysiert und in einen Zusammenhang gebracht werden können. Die Gefahr der Selektion von gewünschten oder erwarteten Genen wird somit vermieden.

3.2.8 RNA-Isolierung mittels des Single Cell-to-CT™ Kits

Zur Validierung der Ergebnisse des Microarrays wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde zur Isolierung der RNA aus den Utrikeln das Single Cell-to-CT™ Kit (Ambion) verwendet, da mit anderen herkömmlichen Kits nicht ausreichend RNA zur Durchführung einer qRT-PCR isoliert werden konnte. Mit dem Single Cell-to-CT™ Kit ist es möglich, einzelne oder wenige Zellen mittels qRT-PCR zu analysieren. Die Zellen werden zunächst lysiert. Anschließend erfolgt die reverse Transkription und danach die Präamplifikation der cDNA mit den für die qRT-PCR verwendeten TaqMan® Sonden. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Als einzige Abweichung wurde die cDNA für die qRT-PCR in der Konzentration 1:2000 mit DNase/RNase freiem Wasser verdünnt. In Tabelle 3-25 sind das Verbrauchsmaterial und die Geräte des Single Cell-to-CT™ Kit aufgeführt.

Tabelle 3-25: Verbrauchsmaterial und Geräte der RNA-Isolierung für die qRT-PCR.

Verbrauchsmaterial/Geräte	Produktnummer	Hersteller
Single Cell-to-CT™ Kit	4458237	Ambion
DNase/RNase freies Wasser	W4502	Sigma-Aldrich
Thermocycler peqSTAR 2X	95-07002	PEQLAB
Zentrifuge 5415D	5425 26845	Eppendorf
Vortexer (Vortex Genie 2)	G560E	Scientific Industries

3.2.9 Quantitative Real-Time PCR

Grundlagen

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ist ein Verfahren, welches auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) beruht und zudem die Quantifizierung der vorhandenen cDNA ermöglicht. Dabei werden die PCR-Produkte fluoreszenzmarkiert und die aktuelle Menge der PCR-Produkte nach jedem PCR-Zyklus detektiert (sozusagen in „Echtzeit“). Im hier verwendeten System sind die eingesetzten sequenzspezifischen Sondenmoleküle („Probes“) mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter markiert (z. B. TaqMan® Sonden). Der zudem eingesetzte Quencher unterdrückt zunächst die Fluoreszenzemission des Reporters. Erst wenn die Taq-Polymerase während der Synthese des Zweitstrangs die Sonde erreicht, spaltet die 5'-3'-Exonuklease die Sonde und Quencher und Reporter werden separiert. Die so ausgelöste Fluoreszenzemission des Reporters wird messtechnisch vom verwendeten Thermocycler am Ende jedes PCR-Zyklus erfasst. Dabei ist die gemessene Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und somit proportional zur Menge der vorliegenden DNA (Higuchi et al., 1993). Mit Hilfe der Standardkurven- oder der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode lässt sich die ursprünglich vorhandene DNA-Menge ermitteln. Bei anderen quantitativen PCR-Methoden wird dagegen erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung vorgenommen.

Relative Quantifizierung

Um Veränderungen der Genexpression in Proben miteinander zu vergleichen, wird üblicherweise die relative Quantifizierung angewendet. In den jeweiligen Proben werden die Level von zwei verschiedenen Target-Sequenzen (Gen, das analysiert wird und Referenzgen) verglichen und als Verhältnis dargestellt. Das Referenzgen ist ein nicht-reguliertes Gen („Housekeeping“-Gen), das eine konstante Kopienzahl unabhängig von äußeren Einflüssen, Zelltyp und Zellstadium zeigt und konstitutiv exprimiert ist. Mit diesem Referenzgen können die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben normalisiert werden. Als Referenzgen wurde in der vorliegenden Arbeit Actin Beta (ACTB) verwendet. Die Boten-RNA („messenger-RNA“, mRNA) von ACTB ist in den meisten Zellen mäßig exprimiert und kodiert für ein Protein des Zytoskeletts, das in allen eukaryotischen

Zellen existiert. Actin Beta war eines der ersten Referenzgene, die als interne Kontrolle verwendet wurden, und wird immer noch weit verbreitet benutzt. (Kreuzer et al., 1999).

Berechnung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Diese häufig verwendete Methode vergleicht die Ergebnisse der Proben mit einem Kalibrator (z. B. Kontrolle, unbehandelt) sowie mit der Genexpression des „Housekeeping“-Gens (z. B. ACTB), welches zur Normalisierung dient.

Die Berechnung der Genexpression erfolgt folgendermaßen:

$$C_t \text{ Probe} - C_t \text{ ACTB} = \Delta C_t \text{ Probe}$$

$$C_t \text{ Kontrolle} - C_t \text{ ACTB} = \Delta C_t \text{ Kontrolle}$$

$$\Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ Kontrolle} = \Delta\Delta C_t$$

$$\text{Unterschied der Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Wichtig für diese Methode ist, dass die Effizienz der Amplifikation des Referenzgenes und des zu untersuchenden Gens gleich ist. Die Effizienz einer PCR-Reaktion sollte idealerweise bei 2 liegen. Dies bedeutet, dass die Probe bei jedem Zyklus der Amplifikation in der exponentiellen Phase verdoppelt wird. Die Effizienz wird mit einer Standardkurve bestimmt. Eine Effizienz von 100 % einer PCR bedeutet eine Steigung von -3,3 und sollte für eine gute PCR zwischen 90 % und 110 % liegen (Steigung von -3,58 bis 3,10). In Abbildung 3-3 ist dargestellt, wie anhand einer Standardkurve die Effizienz einer Probe berechnet werden kann.

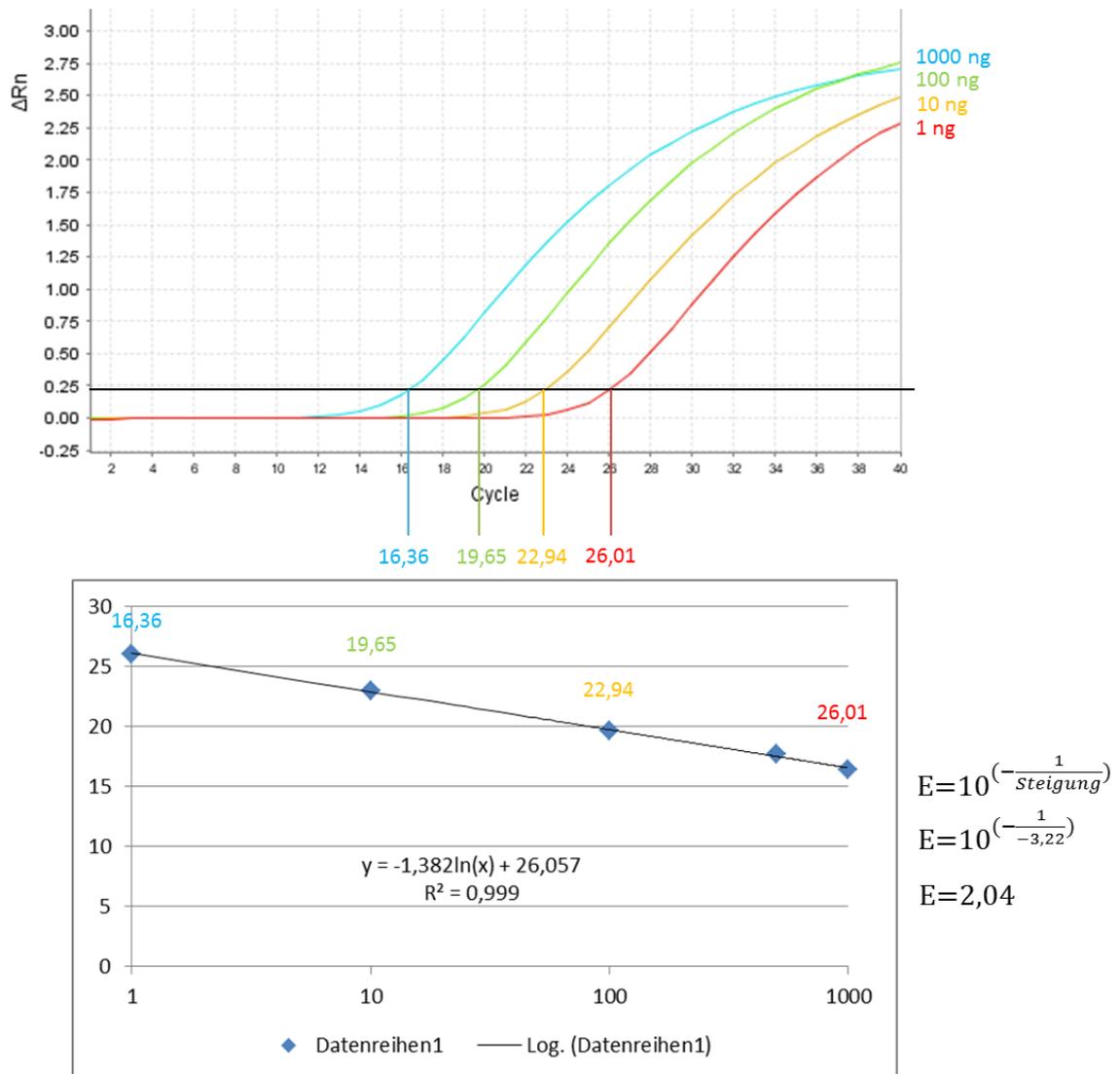


Abbildung 3-3: Berechnung der Effizienz anhand einer Standardkurve.

Für die qRT-PCR wurden die TaqMan[®] Sonden in Tabelle 3-26 verwendet. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, welche für die qRT-PCR benötigt wurden, sind in Tabelle 3-27 aufgeführt. Die qRT-PCR wurde mit dem Gerät „StepOnePlus™ Real-Time PCR System“ nach dem Programm in Tabelle 3-29 durchgeführt. Weitere Geräte sind in Tabelle 3-28 zu finden. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm „REST 2009“ (Michael W. Pfaffl (Technische Universität München) und QIAGEN).

3 Material und Methoden

Tabelle 3-26: TaqMan® Sonden der quantitativen Real-Time PCR.

Sonde	Assaynummer
ACTB 1	4352933E
ACTB 2	Mm01205647_g1
Gpx3	Mm00492427_m1
Pdgfra	Mm00440701_m1
Prkaa2	Mm01264789_m1
Relt	Mm00723872_m1
Timm17a	Mm0421358_s1

Tabelle 3-27: Verbrauchsmaterial und Chemikalien für die quantitative Real-Time PCR.

Verbrauchsmaterial/Chemikalie	Produktnummer	Hersteller
RNase ERASE	821682	ICN Biomedicals, Inc.
Optical Adhesive Film Micro Amp™	4311971	Applied Biosystems
Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 80 (1 ml) Micro Amp™	4346906	Applied Biosystems
TaqMan® 2x Universal Master Mix	58004344-01	Applied Biosystems
DNase/RNase free water	W4502	Sigma-Aldrich

Tabelle 3-28: Geräte für die quantitative Real-Time PCR.

Gerät	Produktnummer	Hersteller
Zentrifuge 5430R	5428 000.210	Eppendorf
Swing bucket rotor A-2-MTP	5427 700.005	Eppendorf
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	436598	Applied Biosystems
StepOne™ Software v2.0.2		Applied Biosystems

Tabelle 3-29: Programm des Real-Time PCR Geräts.

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

4 Ergebnisse

4.1 Histologische Charakterisierung des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Maus

4.1.1 Strukturelle Veränderungen

Someya et al. beschreiben einen schweren Verlust der inneren und äußeren Haarzellen der basalen Cochlea von homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäusen (Someya et al., 2008). Zur Untersuchung der strukturellen Veränderungen des peripheren vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Mäuse wurde zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) (siehe Abbildung 4-1) sowie eine Nissl-Färbung (siehe Abbildung 4-2) der vestibulären Strukturen der 13 Monate alten Mäuse durchgeführt. Eine exakte quantitative Analyse der Haarzellen wäre nur mit stereologischen Methoden verlässlich, welche im Rahmen dieser Studien jedoch nicht praktikabel waren. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Cochlea von Someya et al. waren keine strukturellen Veränderungen in Ampulle, Sacculus oder Utrikel der homozygoten Mäuse zu erkennen.

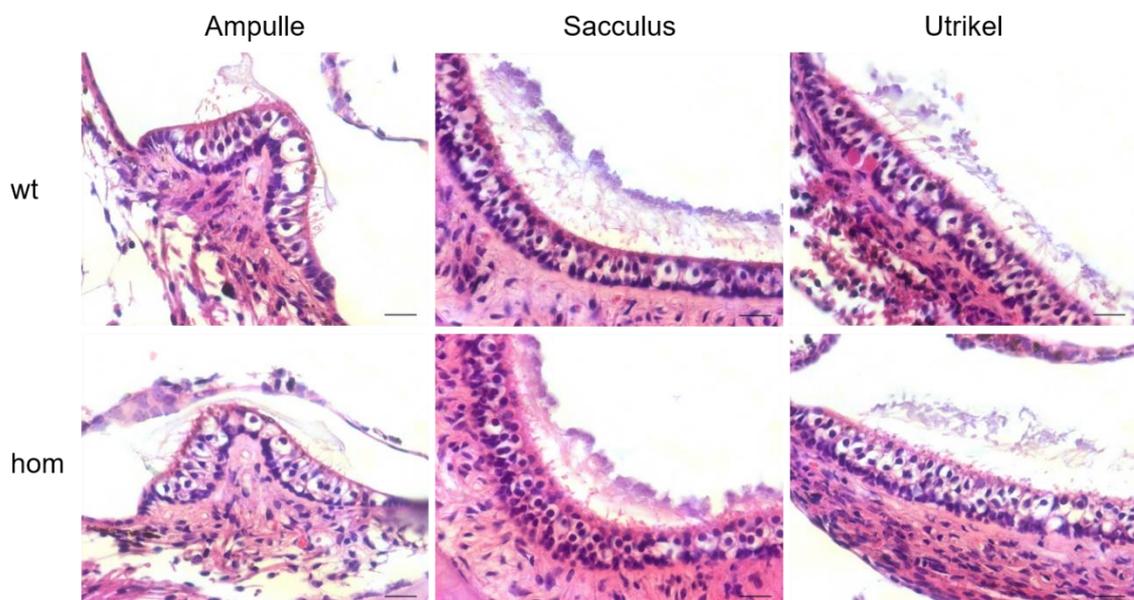


Abbildung 4-1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Felsenbeine von „mtDNA-mutator“-Mäusen (hom, n = 5) und Wildtyp-Mäusen (wt, n = 5). In der Ampulle, dem Sacculus sowie dem Utrikel waren bei den homozygoten Mäusen keine strukturellen Veränderungen nachweisbar. Vergrößerung 40-fach, Maßstabsbalken 20 μ m.

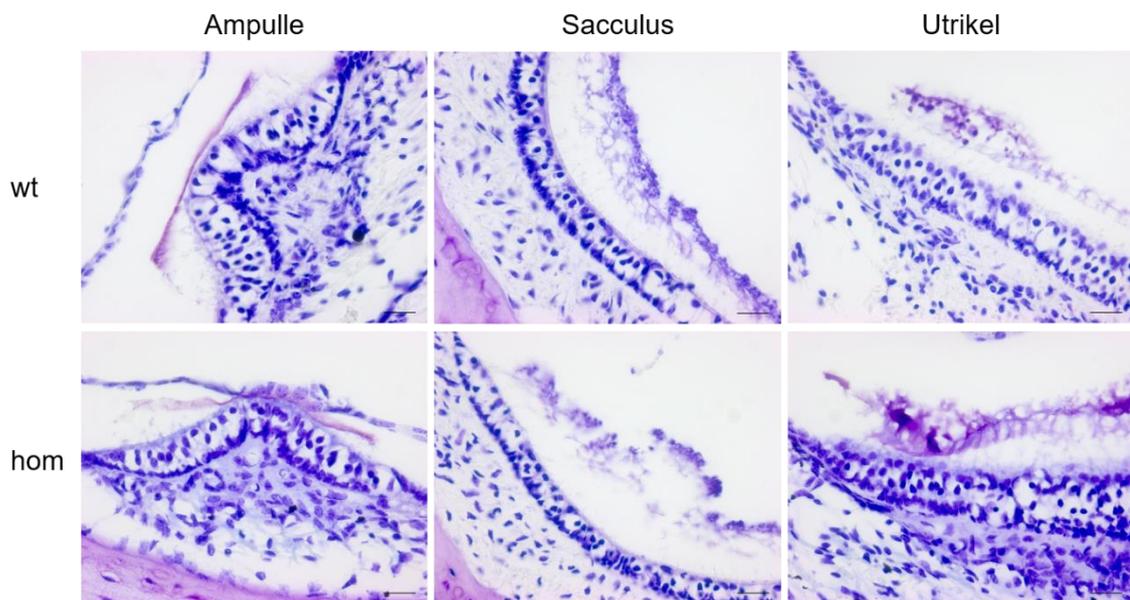


Abbildung 4-2: Nissl-Färbung der Felsenbeine von „mtDNA-mutator“-Mäusen (hom, n = 5) und Wildtyp-Mäusen (wt, n = 5). In der Ampulle, dem Sacculus sowie dem Utrikel waren bei den homozygoten Mäusen keine strukturellen Veränderungen nachweisbar. Vergrößerung 40-fach, Maßstabsbalken 20 μ m.

4.1.2 Oxidativer Stress

Nach der mitochondrialen Theorie des Alterns von Harman (siehe 1.4.2) geht eine Schädigung der mtDNA mit einer Zunahme des oxidativen Stresses in den betroffenen Zellen einher. Deshalb wurde untersucht, ob die Deletionen der mtDNA einen Einfluss auf das Auftreten von oxidativem Stress in den Haarzellen des vestibulären Systems haben. Die 8-OHdG-Färbung zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied in Ampulle, Sacculus und Utrikel im Vergleich von homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäusen zum Wildtyp (siehe Abbildung 4-3). Auch in den Untersuchungen der Cochlea hatten sich keine Anzeichen erhöhten oxidativen Stresses ergeben (Kujoth et al., 2005). Dahingegen konnten Kolesar et al. im Muskelgewebe von „mtDNA-mutator“-Mäusen eine erhöhte oxidative Schädigung nachweisen (Kolesar et al., 2014). Dies ist möglicherweise auf gewebespezifische Unterschiede zurückzuführen.

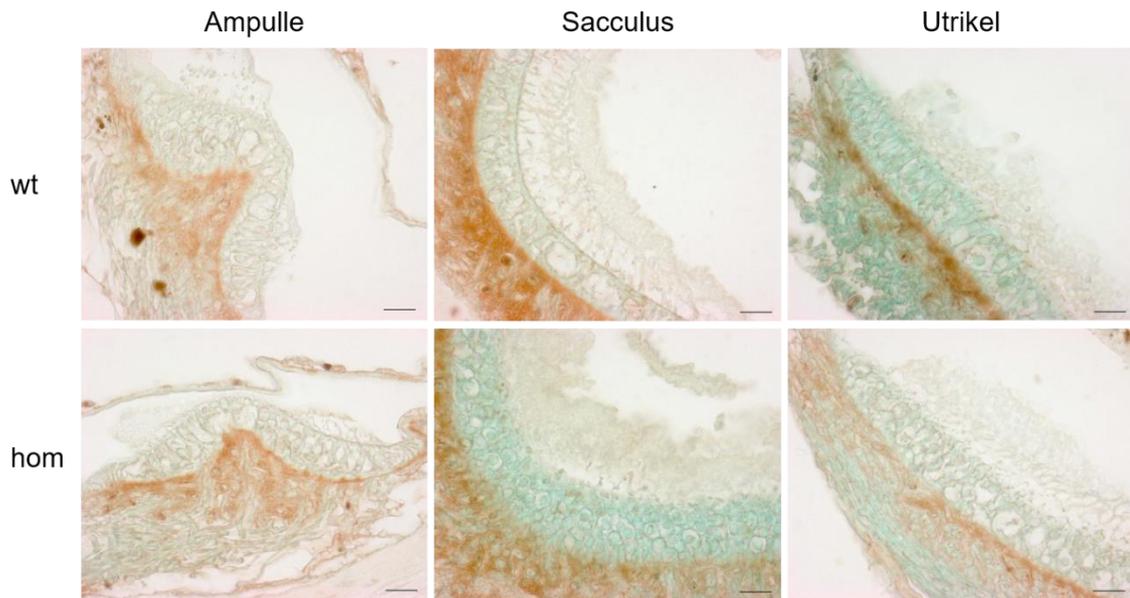


Abbildung 4-3: 8-OHdG-Färbung der Felsenbeine von „mtDNA-mutator“-Mäusen (*hom*, $n = 5$) und Wildtyp-Mäusen (*wt*, $n = 5$). In der Ampulle, dem Sacculus sowie dem Utrikel war bei den homozygoten Mäusen kein oxidativer Stress nachweisbar. Vergrößerung 40-fach, Maßstabsbalken 20 μm .

4.1.3 Apoptose

Eine höhergradige mitochondriale Dysfunktion kann über den mitochondrialen Signalweg der Apoptose zu einer Permeabilisierung der äußeren Membran und einer Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol, sowie der Aktivierung von Caspase-3 führen (Green and Kroemer, 2004). Mit dem TUNEL-Assay ist es möglich, apoptotische Zellen in einem Gewebe zu identifizieren. Mit jedem Versuch wird eine Positiv- und Negativkontrolle angefertigt. Bei der Positivkontrolle werden durch DNase Strangbrüche generiert, weshalb bei der Kontrolle alle Zellen angefärbt sein sollten. Im Versuchsgewebe dagegen sollten nur die apoptotischen Zellen angefärbt sein.

Abbildung 4-4 zeigt exemplarisch die gefärbten Sacculi einer homozygoten „mtDNA-mutator“-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Als Vergleich wurde die Positivkontrolle herangezogen, welche ebenfalls dargestellt ist. Die Bildanalyse des TUNEL-Assays zeigte für die homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäuse ($n = 5$) einen erhöhten Nachweis apoptotischer Zellen ($p = 0,006$) in den Ampullen, dem Sacculus und dem Utrikel im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ($n = 5$). In Abbildung 4-5 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Die Anzahl der apoptotischen Zellen war im Sacculus am stärksten ausgeprägt. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den Untersuchungen von Kujoth et al., welche eine

Zunahme der apoptotischen Zellen in verschiedenen Geweben, wie Herz, Leber und Muskel, bei homozygoten Tieren fanden (Kujoth et al., 2005).

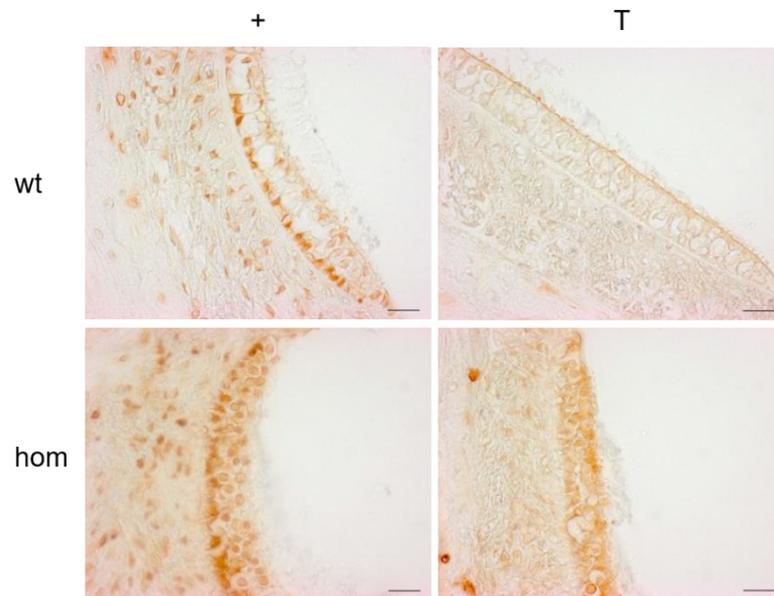


Abbildung 4-4: TUNEL-Assay (T) an Sacculi homozygoter „mtDNA-mutator“-Mäuse (hom, n = 5) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (wt, n = 5) mit Positivkontrolle (+). Vermehrtes Auftreten apoptotischer Zellen im Sacculus der „mtDNA-mutator“-Mäuse. Vergrößerung 40-fach, Maßstabsbalken 20 μm .

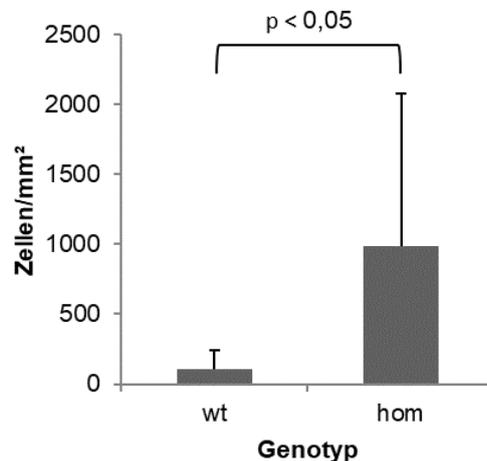


Abbildung 4-5: Anzahl der apoptotischen Zellen im vestibulären System der homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäuse (hom, n = 5) und den Wildtyp-Mäusen (wt, n = 5). In den homozygoten Mäusen fanden sich signifikant mehr apoptotische Zellen pro Fläche ($p = 0,006$).

4.1.4 Auswirkung der Deletionen in der mtDNA auf die Atmungskettenproteine im vestibulären System

Alle 13 Proteine, die von der mtDNA kodiert werden, sind Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette. Veränderungen der Gensequenz des mitochondrialen Genoms können zu einer Verminderung der Energieproduktion über die Atmungskette führen. Allerdings können in Zellen von Säugetieren bis zu mehrere hundert Kopien der mtDNA mit verschiedenen Veränderungen vorliegen, weshalb es zu einem Schwelleneffekt kommt (siehe 1.4.2).

Um zu untersuchen, ob eine Verminderung der Proteinmenge der Atmungskettenkomplexe in den homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäusen vorliegt, wurde eine immunhistochemische Färbung von Untereinheiten der Komplexe I, II und IV durchgeführt (siehe Abbildung 4-6). Nur Untereinheiten von Komplex I und IV werden mitochondrial kodiert, der Komplex II wird gänzlich nukleär kodiert. Es wurde die Intensität der Färbung von NDUF8 (Komplex I) und Untereinheit I des Komplexes IV in je 20 Haarzellen des Sacculus sowie des Utrikels gemessen. Als Referenz wurde die Färbung der 70kDa Untereinheit des Komplexes II von Sacculus und Utrikel herangezogen. Die Messwerte der einzelnen Haarzellen von NDUF8 (Komplex I) und Untereinheit I von Komplex IV wurden zum Messwert der Haarzellen der 70kDa Untereinheit von Komplex II normalisiert. Es zeigte sich keine signifikante Verminderung der Proteinmenge der Atmungskettenkomplexe in Haarzellen des Sacculus oder Utrikels der homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäuse (n = 5) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (n = 4) (siehe Tabelle 4-1, Tabelle 4-2, Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8). Die Färbung des Komplexes IV der Utrikel der homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäuse zeigte eine geringere Intensität, was jedoch als nicht signifikant nachgewiesen werden konnte ($p = 0,06$). Diese Ergebnisse decken sich mit bisherigen Untersuchungen an Herzmuskelzellen homozygoter „mtDNA-mutator“-Mäuse. Dort ist die Proteinmenge der Untereinheit II des Komplexes IV ebenfalls nicht vermindert (Trifunovic et al., 2004).

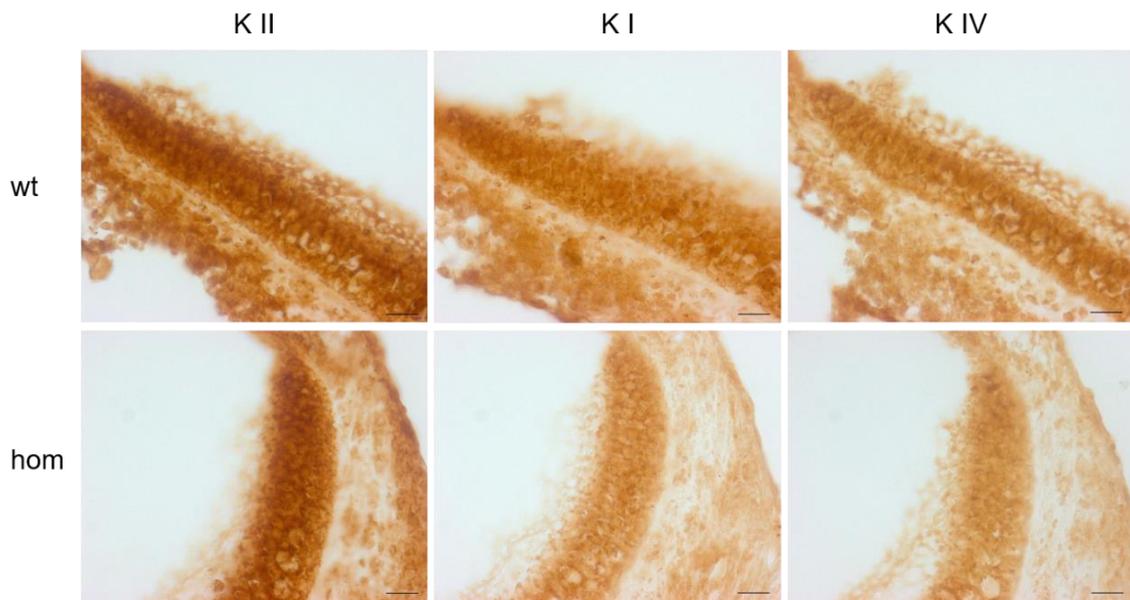


Abbildung 4-6: Immunhistochemische Färbung der Atmungskettenkomplexe an Utrikeln homozygoter „mtDNA-mutator“-Mäuse (hom) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (wt). Es bestand keine Verminderung der Proteinmengen der Atmungskettenkomplexe in den „mtDNA-mutator“-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. K II = Komplex II; K I = Komplex I; K IV = Komplex IV. Vergrößerung 40-fach, Maßstabsbalken 20 μ m.

Tabelle 4-1: Mittelwerte der Quotienten der Intensitätsmessung der Atmungskettenkomplexfärbung Komplex I/Komplex II. Ein größerer Wert bedeutet, dass die Färbung eine geringere Intensität hat und somit weniger Atmungskettenproteine vorhanden sind. wt = Wildtyp (n = 4), hom = homozygot (n = 5).

Komplex I / Komplex II	wt	hom	p-Wert
Utrikel	1,42	1,44	0,48
Sacculus	1,32	1,28	0,30
Utrikel und Sacculus	1,37	1,37	0,92

Tabelle 4-2: Mittelwerte der Quotienten der Intensitätsmessung der Atmungskettenkomplexfärbung Komplex IV/Komplex II. Ein größerer Wert bedeutet, dass die Färbung eine geringere Intensität hat und somit weniger Atmungskettenproteine vorhanden sind. wt = Wildtyp (n = 4), hom = homozygot (n = 5).

Komplex IV / Komplex II	wt	hom	p-Wert
Utrikel	1,50	1,54	0,06
Sacculus	1,33	1,34	0,55
Utrikel und Sacculus	1,41	1,44	0,13

4.1.5 Genexpressionsanalyse im vestibulären System der „mtDNA-mutator“-Mäuse

Ergänzend zu den histologischen Untersuchungen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe eine Genexpressionsanalyse aus Homogenaten des explantierten vestibulären Systems dieser Mäuse durchgeführt. Neben der Interpretation einzelner, differentiell regulierter Gene, ermöglichte eine Signalweganalyse einen Überblick über mögliche adaptive Genregulationsmechanismen in der Folge der mitochondrialen Mutationen.

Diese Analyse, unter Verwendung des Programms „Ingenuity Pathway Analysis“ (IPA), erbrachte eine signifikante Anreicherung differentiell regulierter Gene im „Ataxia Telangiectasia Mutated“ (ATM)-Signalweg (siehe Tabelle 4-3). Die Serin-Proteinkinase ATM ist ein Signalmolekül für DNA-Schäden (Shiloh and Ziv, 2013). ATM wird durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert und es erfolgt über eine Rekrutierung von Reparaturproteinen einerseits unmittelbar der Versuch einer „Reparatur“ der DNA. Bei ausgeprägten, irreparablen DNA-Schäden leitet die konstante Aktivierung von ATM andererseits über die Regulation des Zellzyklus die zelluläre Seneszenz oder über die Induktion der Apoptosekaskade auch den Zelltod ein.

Als weiteren interessanten Signalweg wurde eine differentielle Regulation des Proteinkinase-A-Signalwegs detektiert. Diese cAMP-abhängige Proteinkinase ist an der Regulation des Energiestoffwechsels und der zellulären Reaktion auf metabolischen Stress beteiligt (McKnight et al., 1998). Auch dies ist in Hinblick auf die mitochondriale Störung plausibel.

Tabelle 4-3: Genexpressionsanalyse aus Homogenaten des vestibulären Systems der 13 Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (mit freundlicher Genehmigung von Mattias Elstner und Sonja Brosel).

	Ingenuity Signalwege	Gene	Herab-reguliert	Hoch-reguliert	p-Wert
1	ATM Signaling	93	9 %	8 %	0,003
2	Ephrin B Signaling	71	5 %	13 %	0,004
3	Protein Kinase A Signaling	363	5 %	7 %	0,006
4	cAMP-mediated Signaling	211	5 %	7 %	0,019
5	Proline Biosynthesis I	4	25 %	25 %	0,035
6	Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	50	12 %	4 %	0,045

4.2 Etablierung einer Zellkultur und Testung der pharmakologischen Intervention

4.2.1 Fluoreszenzfärbung der „Utrikel-Explants“

Die Präparation des Utrikels aus dem Felsenbein ist ein technisch anspruchsvoller Prozess, bei dem vorsichtig gearbeitet werden muss, um den Utrikel nicht zu beschädigen. Die Färbung der Zellkerne der Haar- und Stützzellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ermöglichte den Utrikel im Fluoreszenzmikroskop darzustellen (siehe Abbildung 4-9). Um das Aktinskelett und die Stereozilien auf der Oberfläche der Utrikel sichtbar zu machen, wurden die explantierten Utrikel („Utrikel-Explants“) zusätzlich mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Somit konnte veranschaulicht werden, dass der Utrikel bei der Präparation nicht beschädigt wurde und auch die Behandlung mit z. B. AICAR in Kultur keine negativen Einflüsse hat. Abbildung 4-10 zeigt die mit Phalloidin gefärbten „Utrikel-Explants“ in unterschiedlicher Vergrößerung. Das Aktinskelett und die Stereozilien sind intakt.

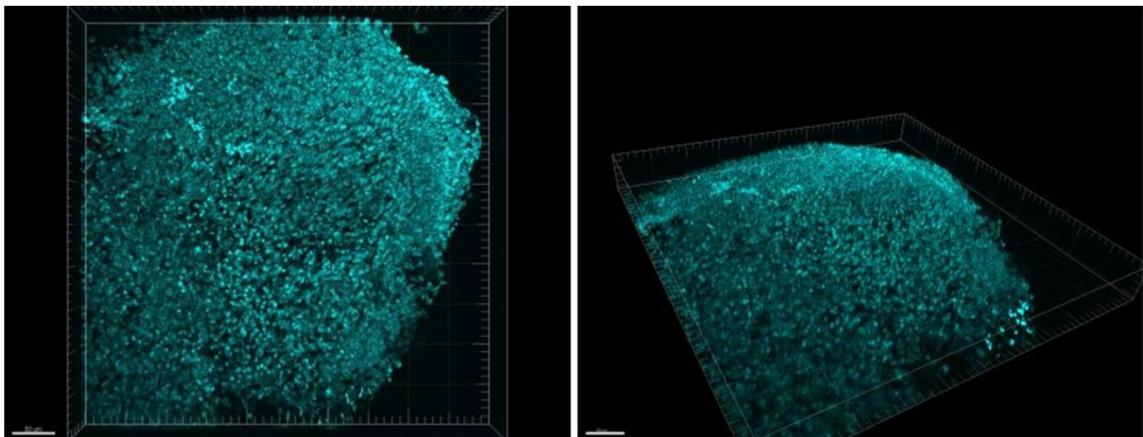


Abbildung 4-9: Anfärbung der Zellkerne der explantierten Utrikel mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). Links Ansicht von oben, rechts räumliche Ansicht. Maßstabsbalken 50 μm .

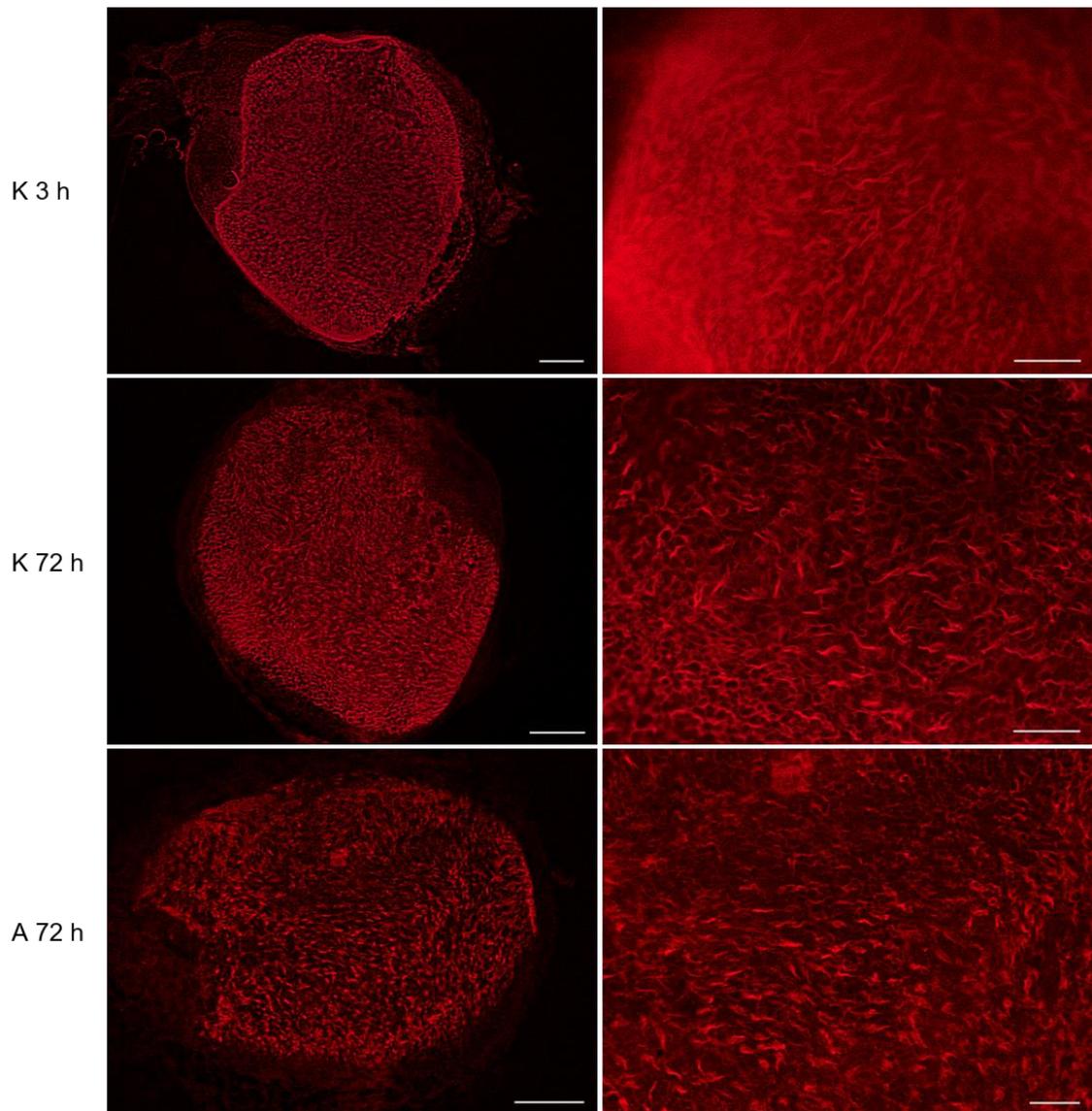


Abbildung 4-10: Phalloidin-Färbung der explantierten Utrikel. Das Aktinskelett und die Stereozilien sind angefärbt. Keine Beschädigung der Utrikel durch die Präparation. K 3 h = Kontrolle, 3 Stunden in Kultur ohne Behandlung; K 72 h = Kontrolle, 72 Stunden in Kultur ohne Behandlung; A 72 h = Utrikel 72 Stunden in Kultur, mit 300 μM AICAR behandelt. Linke Spalte Vergrößerung 5-fach, Maßstabsbalken 100 μm ; rechte Spalte Vergrößerung 20-fach, Maßstabsbalken 30 μm .

LIVE/DEAD®-Assay

Um zu zeigen, dass die Utrikel nicht nur strukturell, sondern auch physiologisch intakt sind, wurde ein LIVE/DEAD®-Assay durchgeführt. Die intakten Zellen färben sich grün, die abgestorbenen Zellen werden rot angefärbt. Der Assay wurde an „Utrikel-Explants“ durchgeführt, die unterschiedlich lange in Kultur waren oder auch mit AICAR behandelt waren ($n = 4$). Es zeigte sich nur eine geringe Zunahme der abgestorbenen Zellen mit zunehmender Länge in Kultur. In Abbildung 4-11 sind die gefärbten Utrikel zu sehen. In Abbildung 4-12 sind die Er-

4 Ergebnisse

gebnisse der Messung des prozentualen Rotanteils pro Bild zu sehen. Durch die Behandlung mit AICAR für 72 Stunden zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ein Trend zur Abnahme der abgestorbenen Zellen ($p = 0,08$).

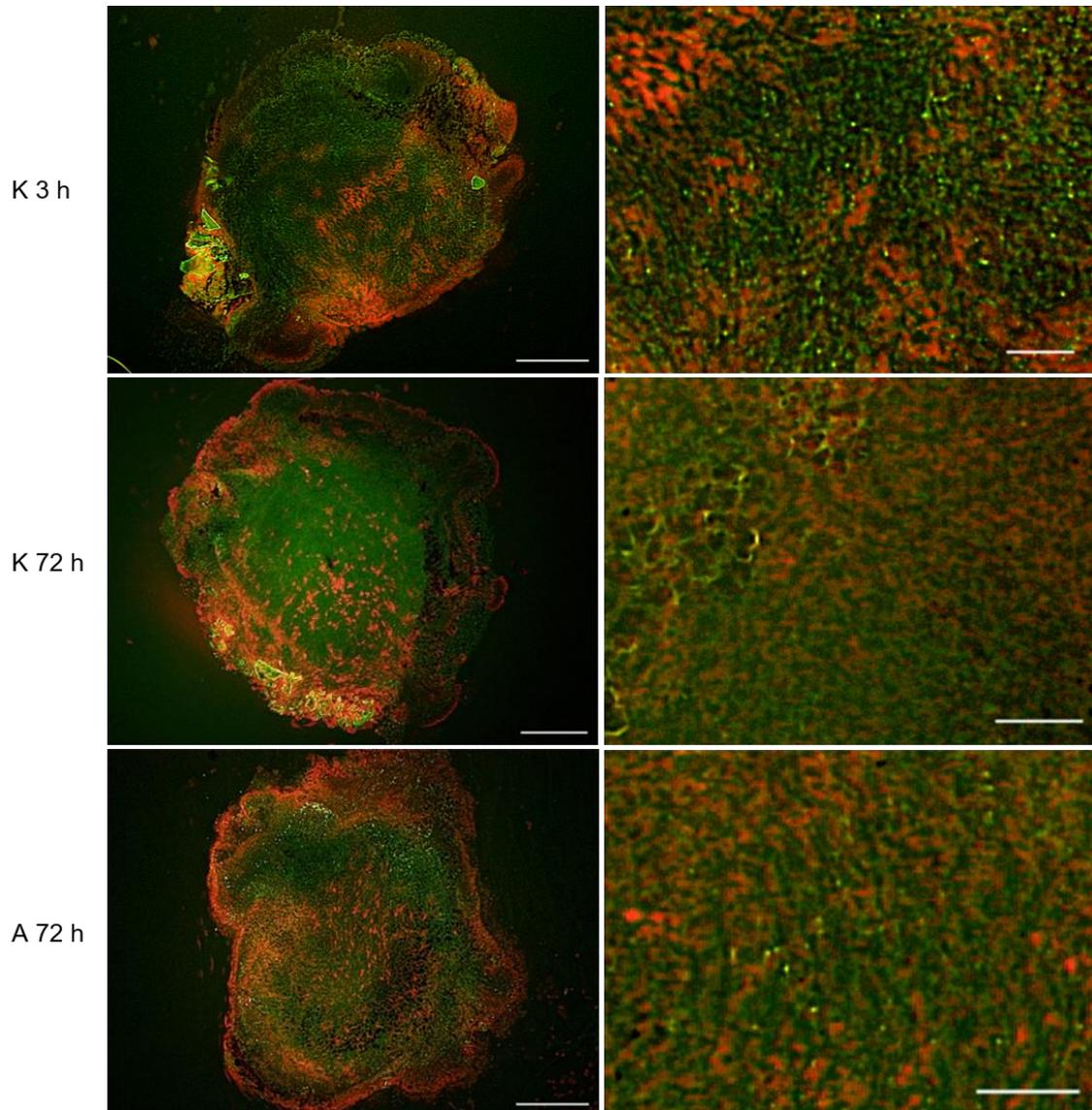


Abbildung 4-11: Utrikel gefärbt mit dem LIVE/DEAD®-Assay. Mit zunehmender Länge der Utrikel in Kultur zeigte sich nur ein geringer Anstieg der abgestorbenen Zellen (rot) (K 3 h vs. K 72 h). K 3 h = Kontrolle, 3 Stunden in Kultur ohne Behandlung; K 72 h = Kontrolle, 72 Stunden in Kultur ohne Behandlung; A 72 h = Utrikel 72 Stunden in Kultur, mit 300 μ M AICAR behandelt. Linke Spalte Vergrößerung 5-fach, Maßstabsbalken 200 μ m; rechte Spalte Vergrößerung 30-fach, Maßstabsbalken 50 μ m.

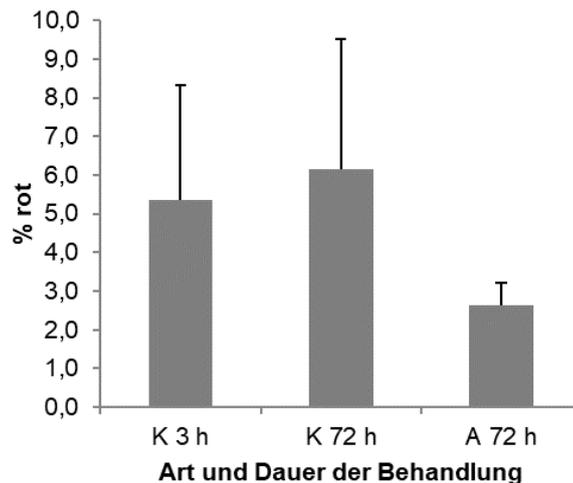


Abbildung 4-12: Messung des prozentualen Rotanteils des LIVE/DEAD®-Assays der Utrikel. Mit zunehmender Länge der Utrikel in Kultur zeigte sich nur ein geringer Anstieg der abgestorbenen Zellen (K 3 h ($n = 4$) vs. K 72 h ($n = 4$)). Durch die Behandlung mit AICAR für 72 h (A 72 h, $n = 4$) zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (K 72 h) ein Trend zur Abnahme der abgestorbenen Zellen ($p = 0,08$). K 3 h = Kontrolle, Utrikel 3 Stunden in Kultur ohne Behandlung; K 72 h = Kontrolle, Utrikel 72 Stunden in Kultur ohne Behandlung; A 72 h = Utrikel 72 Stunden in Kultur, mit $300 \mu\text{M}$ AICAR behandelt.

Mittels der Fluoreszenzfärbung und des LIVE/DEAD®-Assays wurde gezeigt, dass eine Kultur der „Utrikel-Explants“ möglich ist. Zur Untersuchung der Therapieeffekte von AICAR und Bezafibrat wurde eine Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse durchgeführt.

4.2.2 Microarray-basierte Genexpressionsanalyse der „Utrikel-Explants“

Zur Hypothesengenerierung, und um neue molekulare Mechanismen aufzudecken, wurde zudem eine Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse durchgeführt. Die explantierten Utrikel der zehn bis 14 Tage alten Wildtyp-Mäuse wurden für 72 Stunden mit $300 \mu\text{M}$ AICAR oder $500 \mu\text{M}$ Bezafibrat behandelt. Diese Konzentrationen, sowie der Zeitraum, haben sich nach Untersuchungen mittels des LIVE/DEAD®-Assays und der Expressionsanalyse relevanter Gene mittels qRT-PCR am vielversprechendsten erwiesen. Als Kontrolle wurden Utrikel von gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen, welche sich über 72 Stunden ohne Behandlung in Kultur befanden, herangezogen.

Zudem wurde erstmalig der Effekt von AICAR auf die „mtDNA-mutator“-Maus untersucht. Utrikel von ca. fünf Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen wurden für 72 Stunden mit $300 \mu\text{M}$ AICAR behandelt. Als Kontrolle dienten Utrikel von

gleichaltrigen „mtDNA-mutator“-Mäusen, welche sich über 72 Stunden ohne Behandlung in Kultur befanden.

Die im Microarray differentiell regulierten Gene wurden mit Hilfe des Programmes „Ingenuity Pathway Analysis“ (IPA) analysiert, um eine mögliche Vorselektion (Bias) zu vermeiden. Dieses Programm wertet aus, in welchen zellulären Signalwegen überzufällig häufig Gene differentiell reguliert sind. Somit konnten die Gene unvoreingenommen analysiert und in Zusammenhang gebracht werden.

Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit AICAR

Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass AICAR die mitochondriale Biogenese *in vitro* sowie *in vivo* anregt (Golubitzky et al., 2011; Viscomi et al., 2011; Winder et al., 2000). Dies geschieht über die Aktivierung der AMPK und PGC-1 α . Um zu untersuchen, ob dieser Mechanismus auch in den „Utrikel-Explants“ auftritt, sowie um neue Erkenntnisse über den Effekt von AICAR auf Haar- und Stützzellen im vestibulären System zu erlangen, wurde eine Genexpressionsanalyse mittels eines Microarrays durchgeführt. Die explantierten Utrikel der zehn bis 14 Tage alten Wildtyp-Mäuse befanden sich für 72 Stunden mit 300 μ M AICAR (n = 5) bzw. ohne AICAR (n = 5) in Kultur. Für die Auswertung der Microarray-Daten mittels IPA wurden die nach Bonferroni-Korrektur signifikanten 1386 Transkripte analysiert ($p < 0,05$). Davon erkannte das Programm 1290 korrekt, 96 konnten keinem Gen zugeordnet werden. Somit wurden 1158 Transkripte kuratierten Signalwegen klar zugeordnet. Es zeigten sich 114 signifikant differentiell regulierte Signalwege ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der Analyse der Microarray-Daten mit Hilfe des Analyseprogramms IPA sind auszugsweise in Tabelle 4-4 sowie im Anhang in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

4 Ergebnisse

Tabelle 4-4: Die ersten 10 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit AICAR. PDGF = „Platelet-derived growth factor“; NFAT = „Nuclear factor of activated T cells“; PPAR α = peroxisomaler Proliferator-aktivierter Rezeptor; RXR α = Retinoid-X-Rezeptor alpha; AMPK = AMP-aktivierte Proteinkinase.

	Ingenuity Signalwege	Gene	Herab-reguliert	Hoch-reguliert	p-Wert
1.	Cardiac Hypertrophy Signaling	209	0 %	15 %	< 0,001
2.	PDGF Signaling	77	0 %	21 %	< 0,001
3.	Thrombin Signaling	183	0 %	15 %	< 0,001
4.	Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	168	0 %	15 %	< 0,001
5.	Ceramide Signaling	76	0 %	20 %	< 0,001
6.	PPAR α /RXR α Activation	156	0 %	15 %	< 0,001
7.	G α 12/13 Signaling	113	0 %	17 %	< 0,001
8.	AMPK Signaling	171	0 %	15 %	0,001
9.	Protein Kinase A Signaling	349	0 %	12 %	0,001
10.	G Beta Gamma Signaling	86	0 %	17 %	0,001
68.	PPAR Signaling	86	0 %	14 %	0,019

Die Auswertung der Microarray-Daten mit dem Analyseprogramm IPA zeigte differentiell regulierte Signalwege, welche Funktionen im Bereich der Zellproliferation und der Entwicklung besitzen.

Bei dem Signalweg „Cardiac Hypertrophy Signaling“ waren von den 209 Genen 0 % herabreguliert und 15 % hochreguliert ($p < 0,05$). Dieser Signalweg fasst intrazelluläre Signalwege, welche hypertrophe Effekte vermitteln, zusammen. Dazu gehören der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-, der Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)- und der „Nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT)-Signalweg. Der MAPK-Signalweg enthält Phosphorylierungskaskaden von mindestens drei in Reihe geschalteten Kinasen. Über die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade, die von Wachstumsfaktoren aktiviert wird, werden Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung vermittelt. Zytokine, wie Tumornekrosefaktoren oder Interleukin-1-Rezeptor Typ 1, aktivieren die p38 MAPK-Kaskade, worüber Entzündung, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung moduliert werden. Dies wird zudem über eine dritte Kaskade, den Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK)/c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK)-Signalweg vermittelt, welcher über Stress, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert wird.

Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert Zellwachstum und -proliferation, sowie den Zellstoffwechsel. Dieser Signalweg ist in vielen Tumoren aktiviert, was zu einer Reduktion von Apoptose und verstärkter Zellproliferation führt.

Die calciumabhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin aktiviert den Signalweg „Nuclear factor of activated T cells“ (NFAT). NFAT sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, welche intranukleär Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren bilden. Sie sind wichtig bei der Immunantwort, der Entwicklung von Herz- und Skelettmuskel sowie dem Nervensystem. An vierter Stelle fand sich auch der Signalweg „Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy“. Von den 168 Genen waren 0 % herabreguliert und 15 % hochreguliert ($p < 0,05$). Über Wachstumsfaktoren und Zytokine werden Signale zur Zellproliferation und -entwicklung vermittelt. Der Thrombin-Signalweg wird ebenfalls mit Zellproliferation und Tumorwachstum in Verbindung gebracht. Von den 183 Genen waren 0 % herabreguliert und 15 % hochreguliert ($p < 0,05$).

An zweiter Stelle der Signalweganalyse fand sich der „Platelet-derived growth factor“ (PDGF)-Signalweg. Von den 77 Genen waren 0 % herabreguliert und 21 % hochreguliert ($p < 0,05$). PDGFs gehören zu einer großen Familie von Wachstumsfaktoren, welche von Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert werden. PDGF spielt eine Rolle bei Zellmigration, Zellproliferation, der Embryogenese, Wundheilung und Angiogenese (Li and Eriksson, 2003). Die PDGF Familie besteht aus den vier Wachstumsfaktoren PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D, welche sich zu Homo- oder Heterodimeren zusammenlagern. Die Dimere binden jeweils zwei Rezeptoren, „Platelet-derived growth factor“ Rezeptor alpha oder beta (PDGF-R- α , PDGF-R- β). Dadurch können sich diese gegenseitig an Tyrosinen phosphorylieren und somit aktivieren. Anschließend leiten sie das Signal durch Phosphorylierung anderer Proteine im Zellinneren weiter, wodurch auch der PI3-Kinase-Signalweg aktiviert wird.

AICAR wurde schon mehrfach als Agonist der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) beschrieben. Beim AMPK-Signalweg waren von den 128 Genen 0 % herabreguliert und 15 % hochreguliert ($p < 0,05$). Der AMPK-Signalweg beeinflusst das Zellwachstum und die Proliferation von Zellen. Die AMPK ist ein zentraler Regulator des Stoffwechsels und Energieverbrauchs von Zellen, da sie durch den ATP-Spiegel in der Zelle reguliert wird. Bei einem sinkenden ATP-Spiegel aktiviert die AMPK die ATP-Produktion über die mitochondriale

Atmungskette und β -Oxidation und inaktiviert energieverbrauchende Signalwege. Auch die mitochondriale Biogenese wird von der AMPK durch die Phosphorylierung von PGC-1 α aktiviert.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der bei der mitochondrialen Biogenese und der β -Oxidation eine Rolle spielt, ist der peroxisomale Proliferator-aktivierte Rezeptor alpha (PPAR α). Er bildet mit seinem obligaten Partner Retinoid-X-Rezeptor (RXR) Heterodimere und ist an der Regulation von Proteinen und Enzymen der β -Oxidation beteiligt. PGC-1 α reguliert gemeinsam mit PPAR α die Expression der mitochondrialen Enzyme der β -Oxidation, wodurch eine Abstimmung mit der mitochondrialen Biogenese möglich ist (Ventura-Clapier et al., 2008). Bei dem Signalweg „PPAR α /RXR α Activation“ waren von den 156 Genen 0 % herabreguliert und 15 % hochreguliert ($p < 0,05$).

Zusammenfassend wurden durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit AICAR bereits bekannte Signalwege differentiell reguliert, die unter anderem an der Regulation der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind, sowie Signalwege, welche bisher noch nicht mit AICAR in Verbindung gebracht wurden und welche Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung regulieren.

Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit Bezafibrat

Bezafibrat aktiviert über die PPARs die mitochondriale Biogenese. Auch in neuronalem Gewebe zeigte Bezafibrat einen positiven Einfluss (Johri et al., 2012). Die explantierten Utrikel der zehn bis 14 Tage alten Wildtyp-Mäuse befanden sich für 72 Stunden mit 500 μ M Bezafibrat ($n = 5$) bzw. ohne Bezafibrat ($n = 5$) in Kultur. Für die Auswertung der Microarray-Daten mittels IPA wurden die nach Bonferroni-Korrektur signifikanten 555 Transkripte analysiert ($p < 0,05$). Davon erkannte das Programm 522 korrekt, 33 konnten keinem Gen zugeordnet werden. Somit wurden 488 Transkripte kuratierten Signalwegen klar zugeordnet. Es zeigten sich 31 signifikant differentiell regulierte Signalwege ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der Analyse der Microarray-Daten mit Hilfe des Analyseprogramms IPA sind auszugsweise in Tabelle 4-5 sowie im Anhang in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

4 Ergebnisse

Tabelle 4-5: Die ersten 10 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit Bezafibrat. PPAR = peroxisomaler Proliferator-aktivierter Rezeptor; AMPK = AMP-aktivierte Proteinkinase.

	Ingenuity Signalwege	Gene	Herab-reguliert	Hoch-reguliert	p-Wert
1.	Wnt/Ca ⁺ pathway	54	0 %	17 %	< 0,001
2.	Lipid Antigen Presentation by Cyclin D1	16	0 %	25 %	0,001
3.	Glutathione Redox Reactions I	15	0 %	20 %	0,010
4.	Prostate Cancer Signaling	80	0 %	9 %	0,011
5.	Glioblastoma Multiforme Signaling	142	0 %	7 %	0,011
6.	PPAR Signaling	86	0 %	8 %	0,016
7.	Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	33	0 %	12 %	0,017
8.	Role of IL-17A in Psoriasis	7	0 %	29 %	0,017
9.	Mitochondrial Dysfunction	135	0 %	7 %	0,022
10.	Cardiac Hypertrophy Signaling	209	0 %	6 %	0,026
23.	AMPK Signaling	171	0 %	6 %	0,035

Die Auswertung der Microarray-Daten der Utrikel, welche mit Bezafibrat behandelt wurden, zeigte Signalwege differentiell reguliert, welche den Kategorien Zellwachstum und -entwicklung, Tumorentstehung, sowie Apoptose und Überleben von Zellen zugeordnet werden können. Dem Wnt/Ca⁺-Signalweg wird eine entscheidende Rolle in der Entwicklung zugeschrieben, wobei neuerdings auch Hinweise für eine Beteiligung an anderen molekularen Mechanismen vorliegen, wie z. B. Krebs, Entzündung und Neurodegeneration. Von den 54 Genen des Signalweges waren 0 % herabreguliert und 17 % hochreguliert ($p < 0,05$). Der Wnt/Ca⁺-Signalweg ist auch im Nervensystem vorhanden (Zhang et al., 2007) und aktiviert über die Proteinkinase C (PKC) und die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) Transkriptionsfaktoren wie NFAT und „cAMP response element-binding protein“ (CREB) (siehe Abbildung 5-2). Des Weiteren war der „Prostate Cancer“-Signalweg differentiell reguliert. Von den 80 Genen des Signalweges waren 0 % herabreguliert und 17 % hochreguliert ($p < 0,05$). Zudem vermittelt der „Glioblastome Multiforme“-Signalweg proliferative Signale. In Glioblastomen sind Rezeptortyrosinkinasen überexprimiert, wie z. B. PDGF-R.

Es ist bereits bekannt, dass Bezafibrat die PPAR-Rezeptoren aktiviert, welche eine wichtige Rolle in der Regelung der mitochondrialen Biogenese spielen. Von den 86 Genen des PPAR-Signalweges waren 0 % herabreguliert und 8 % hochreguliert ($p < 0,05$). Bezafibrat scheint auch im sensorischen Gewebe des vestibulären Systems diesen Effekt zu vermitteln.

Der Signalweg „Mitochondrial Dysfunction“ beinhaltet unter anderem die an der Atmungskette beteiligten Enzyme und Proteine. Diese können bei mitochondrialen Krankheiten in verminderter Aktivität vorliegen, was zu oxidativem Stress führt. Bei der vorliegenden Analyse waren von den 135 Genen des Signalweges 0 % herabreguliert und 8 % hochreguliert ($p < 0,05$). Diese Gene kodieren hauptsächlich für Untereinheiten von Komplex I, III und V, welche also vermehrt exprimiert werden.

Glutathion ist ein bedeutendes Antioxidans und schützt wichtige Bestandteile der Zelle vor reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS). Im Signalweg „Glutathione Redox Reactions I“ waren von den 15 Genen 0 % herabreguliert und 20 % hochreguliert ($p < 0,05$). Eines der hochregulierten Gene des Signalweges ist die Glutathion Peroxidase 3 (GPX3). Die GPX3 gehört zur Familie der Glutathion Peroxidasen, welche Zellen und Proteine vor oxidativen Schäden schützt (Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013). Der antioxidative Effekt von Glitazonen, welche PPAR γ aktivieren, wird über GPX3 vermittelt (Chung et al., 2009).

Somit ist davon auszugehen, dass Bezafibrat einen antioxidativen Effekt in den Neuronen des vestibulären Systems vermittelt.

Behandlung der „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Mäuse mit AICAR

Zum Effekt von AICAR in der „mtDNA-mutator“-Maus liegen bisher in der Literatur keine Daten vor. Um nicht nur die Auswirkungen von AICAR auf gesundes Gewebe, sondern auch auf mutiertes Gewebe zu untersuchen, wurde auch von „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Mäuse eine Microarray-basierte Genexpressionsanalyse durchgeführt.

Die explantierten Utrikel der ca. fünf Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäuse befanden sich für 72 Stunden mit 300 μ M AICAR ($n = 4$) bzw. ohne AICAR ($n = 4$) in Kultur. Für die mit AICAR behandelten Utrikel der „mtDNA-mutator“-Mäuse waren nach Bonferroni-Korrektur keine Gene signifikant reguliert. Daher wurde die weniger stringente Fehlerkorrektur nach Benjamini & Hochberg angewandt.

4 Ergebnisse

Mit einer Falscherkennungsrate von 1 % ($p < 0,01$) verblieben 1711 signifikant regulierte Transkripte. Diese wurden mit Hilfe von IPA analysiert. Davon erkannte das Programm 1409 korrekt, 302 konnten keinem Gen zugeordnet werden. Somit wurden 1126 Transkripte kuratierten Signalwegen klar zugeordnet. Es zeigten sich 43 signifikant differentiell regulierte Signalwege ($p < 0,05$). Die Ergebnisse der Analyse der Microarray-Daten mit Hilfe des Analyseprogramms IPA sind auszugsweise in Tabelle 4-6 sowie im Anhang in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Tabelle 4-6: Die ersten 10 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Mäuse mit AICAR. CREB = „cAMP response element-binding protein“; PPAR α = peroxisomaler Proliferator-aktivierter Rezeptor; RXR α = Retinoid-X-Rezeptor alpha; AMPK = AMP-aktivierte Proteinkinase.

	Ingenuity Signalwege	Gene	Herab-reguliert	Hoch-reguliert	p-Wert
1.	Prostate Cancer Signaling	80	9 %	10 %	< 0,001
2.	Calcium Signaling	155	5 %	10 %	0,001
3.	Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	92	8 %	9 %	0,002
4.	CREB Signaling in Neurons	160	6 %	8 %	0,002
5.	Prolactin Signaling	72	8 %	8 %	0,004
6.	Melanocyte Development and Pigmentation Signaling	83	8 %	7 %	0,005
7.	T Cell Receptor Signaling	93	5 %	10 %	0,005
8.	ErbB4 Signaling	57	7 %	11 %	0,006
9.	Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	85	8 %	7 %	0,006
10.	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	33	3 %	18 %	0,007
21.	PPAR α /RXR α Activation	156	8 %	4 %	0,026
159.	AMPK Signaling	171	3 %	6 %	0,224

Die Analyse der Signalwege, welche durch die Behandlung mit AICAR in den „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Mäuse differentiell reguliert waren, zeigte mehrere Signalwege, die im Zusammenhang mit Tumorwachstum, Zellentwicklung und Zellproliferation stehen. An erster Stelle der Signalweganalyse fand sich der „Prostate Cancer“-Signalweg (siehe Tabelle 4-6). Von den 80 Genen waren 9 % herabreguliert, 10 % hochreguliert ($p < 0,05$). Über diesen Sig-

nalweg wird der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, welcher über das „cAMP response element-binding protein“ (CREB) Apoptose vermindert. Auch über den Calcium-Signalweg wird CREB reguliert, sowie über Calcium Apoptose gesteuert. Von den 155 Genen sind 5 % herabreguliert und 9 % hochreguliert ($p < 0,05$). Die Proliferation von Nervenzellen wird ebenfalls über die Aktivierung von CREB reguliert. Bei dem Signalweg „CREB Signaling in Neurons“ waren von den 160 Genen 6 % herabreguliert und 8 % hochreguliert ($p < 0,05$). Als pleiotropes Zytokin kann Prolaktin über Cyclin D1 sowohl mitogen, als auch über Bcl-X antiapoptotisch wirken und spielt somit eine wichtige Rolle bei Zellproliferation und Differenzierung. Beim Prolaktin-Signalweg waren von den 72 Genen 8 % herabreguliert und 8 % hochreguliert ($p < 0,05$). Auch der „Melanocyte Development and Pigmentation“- , „T Cell Receptor“- und ErbB4-Signalweg sind neben anderen Funktionen an Zellproliferation, Zelldifferenzierung und dem Schutz vor Apoptose beteiligt. Somit scheint AICAR CREB und antiapoptotische Proteine zu aktivieren, was positive Auswirkungen auf die Regeneration der vestibulären Zellen der „mtDNA-mutator“-Maus trotz der vorliegenden Mutationen haben könnte.

Die Aktivierung der AMPK durch AICAR, welche auch in den „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse nachgewiesen werden konnte, scheint bei der „mtDNA-mutator“-Maus weniger ausgeprägt zu sein. Beim AMPK-Signalweg waren von den 171 Genen 3 % herabreguliert und 6 % hochreguliert ($p = 0,22$). Der Signalweg „PPAR α /RXR α Activation“ war dagegen signifikant reguliert ($p < 0,05$). Von den 156 Genen sind 8 % herabreguliert und 4 % hochreguliert ($p < 0,05$). Unter den signifikant hochregulierten Genen fand sich aber auch die AMP-aktivierte Proteinkinase Gamma 1, eine nicht-katalytische Untereinheit der AMPK, was auf eine Aktivierung der mitochondrialen Biogenese hinweist.

Insgesamt erbrachte die Auswertung der Microarray-Daten von mit AICAR behandelten „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Maus Hinweise auf eine Aktivierung der Signalwege der AMPK und der mitochondrialen Biogenese. Die Aktivierung von Signalwegen, die über andere Mechanismen an Zellproliferation und Zellentwicklung beteiligt sind, scheint aber vorrangig zu sein.

4.2.3 Validierung der Ergebnisse des Microarrays mittels quantitativer Real-Time PCR

Um die Ergebnisse des Microarrays zu bestätigen, wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit Genen, welche differentiell reguliert waren, durchgeführt. Dazu wurden Gene ausgewählt, die durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit AICAR oder Bezafibrat differentiell reguliert waren.

Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit AICAR

Durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit AICAR zeigten sich Signalwege differentiell reguliert, welche proliferative und antioxidative Effekte vermitteln. Die katalytische Untereinheit alpha-2 der 5'-AMP-aktivierten Proteinkinase (Prkaa2) ist eine Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK). Die Glutathion Peroxidase 3 (GPX3) wirkt antioxidativ. Sie ist am Signalweg „Glutathion Redox Reactions I“ beteiligt, welcher in der Signalweganalyse an 159. Stelle steht ($p < 0,05$). Der „Platelet derived growth factor receptor alpha“ (PDGF-R- α) ist ein Rezeptor des PDGF Signalweges. Abbildung 4-13A zeigt die Veränderung der Expression der ausgewählten Gene im Microarray. Dies konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden (siehe Abbildung 4-13B).

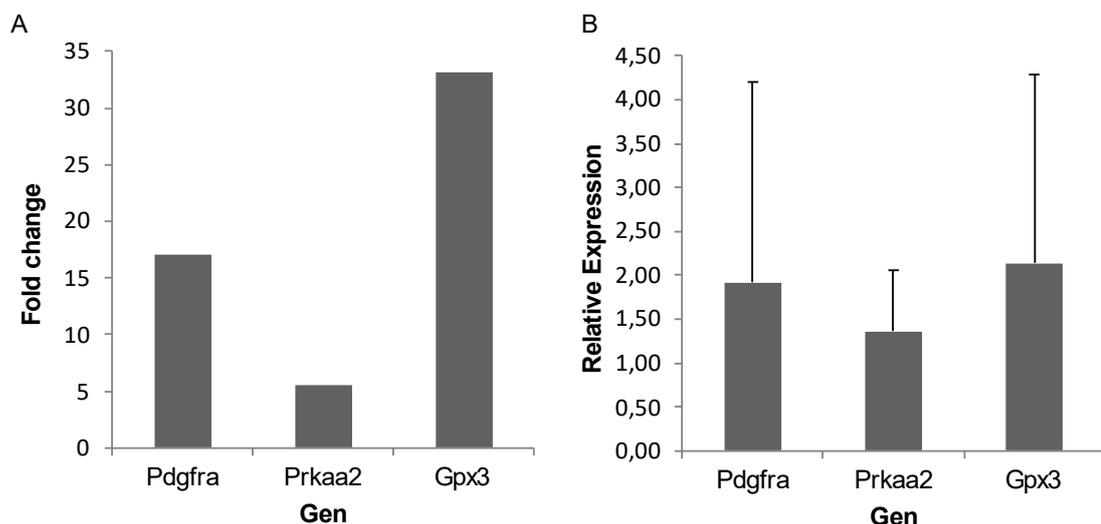


Abbildung 4-13: A. Relative Änderung der Expressionswerte („Fold change“) der differentiell regulierten Gene durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit AICAR im Microarray. B. Relative Expression der differentiell regulierten Gene durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit AICAR in der qRT-PCR als Bestätigung des Microarrays. Balken zeigen Standardabweichung.

Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit Bezafibrat

Durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit Bezafibrat zeigten sich Signalwege differentiell reguliert, welche die mitochondriale Biogenese und Apoptose beeinflussen. Das Gen RELT kodiert für „Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19L“. Dies ist ein Tumornekrosefaktor-Rezeptor, welcher Apoptose induziert. Die Glutathion Peroxidase 3 (GPX3) wirkt antioxidativ. Die Translokase der inneren mitochondrialen Membran 17a („Translocase of inner mitochondrial membrane 17a“, Timm17a) reguliert den mitochondrialen Import. Abbildung 4-14A zeigt die Veränderung der Expression der ausgewählten Gene im Microarray. Dies konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden (siehe Abbildung 4-14B).

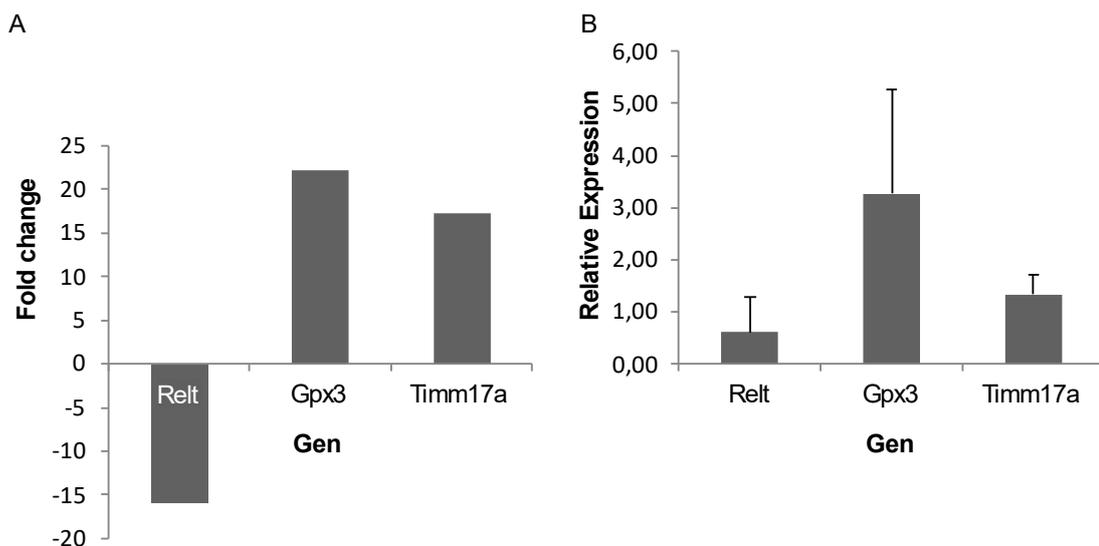


Abbildung 4-14: A. Relative Änderung der Expressionswerte („Fold change“) der differentiell regulierten Gene durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit Bezafibrat im Microarray. B. Relative Expression der differentiell regulierten Gene durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der Wildtyp-Mäuse mit Bezafibrat in der qRT-PCR als Bestätigung des Microarrays. Eine Expression von 1 entspricht einer nicht veränderten Expression. Eine Expression < 1 zeigt somit eine verminderte Expression des Genes, entsprechend einer negativen Expression im Microarray. Balken zeigen Standardabweichung.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der vestibulären Strukturen der „mtDNA-mutator“-Maus

5.1.1 Alterungsphänotyp und Deletionen korrelieren nicht mit vestibulärer Funktion der „mtDNA-mutator“-Maus

Die Phänotypisierung der „mtDNA-mutator“-Mäuse zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein beschleunigtes Altern mit u.a. einer Alopezie, Kyphose, einem reduzierten Körpergewicht und Muskelschwäche. Dies wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004). Die spezifische Testung der vestibulären Funktion zeigte allerdings neben motorischen Defiziten keine eindeutige Störung des Gleichgewichtssystem (siehe 1.8.1). Im Gegensatz dazu ist in der Studie von Someya et al. eine fortgeschrittene Schwerhörigkeit der neun Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen beschrieben (Someya et al., 2008), welche mittels einer Hirnstammaudiometrie („Auditory Brainstem Response“, ABR) untersucht wurde. Eine vergleichbare Methode zur Untersuchung der vestibulären Funktion stellt die Untersuchung von cervikalen Vestibulär Evozierten Myogenen Potentialen (cVEMP) dar. Dies ist neuerdings auch bei Mäusen zur Untersuchung von Schwindel etabliert (Negishi-Oshino et al., 2019). Zur weiteren Untersuchung auf das Vorliegen eines vestibulären Phänotyps der „mtDNA-mutator“-Mäuse könnte nun auch diese Methode herangezogen werden.

Mutationen der mtDNA werden eine wichtige Rolle im Alterungsprozess zugeschrieben (Schon et al., 2012). Zudem treten mit steigendem Alter vermehrt Mutationen und Deletionen der mtDNA im menschlichen Innenohr auf (Bai et al., 1997; Markaryan et al., 2009, 2010). Der Anteil deletierter mtDNA war in den vestibulären und in den cochleären Strukturen der alten „mtDNA-mutator“-Mäusen in unseren Untersuchungen vergleichbar und in Relation zum Wildtyp ca. fünffach erhöht. Es wurde bereits beschrieben, dass sich mtDNA-Deletionen mit einer beschleunigten Geschwindigkeit in Gehirn- und Herzgewebe von „mtDNA-mutator“-Mäusen ansammeln, was zu einer sieben- bis elffachen Erhöhung der mtDNA-Deletionen gegenüber denen in Wildtyp-Mäusen führt

(Vermulst et al., 2008). Zudem wiesen diese Mäuse einen über 500-fachen Anstieg von mtDNA-Punktmutationen in Gehirn und Herz im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen auf (Kujoth et al., 2005; Vermulst et al., 2007). Daher wird intensiv diskutiert, ob Deletionen der mtDNA oder zufällige Punktmutationen ursächlich für eine vorzeitige Alterung der „mtDNA-mutator“-Mäuse sind (Edgar et al., 2010; Kraytsberg et al., 2009; Vermulst et al., 2009). Im Innenohr zeigte sich bei fünf Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen eine 238-fache Erhöhung der Punktmutationen der mtDNA im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen (Kim et al., 2019). Mit zunehmendem Alter der Mäuse kam es jedoch nicht zu einem Anstieg der mtDNA-Punktmutationen. Deletionen der mtDNA akkumulierten dahingegen signifikant mit steigendem Alter im Innenohr von „mtDNA-mutator“-Mäusen. Somit scheint einerseits die höhere Belastung durch mtDNA-Punktmutationen von jungem Alter an, sowie andererseits die altersbedingte Anhäufung von mtDNA-Deletionen zur vorzeitigen Alterung und damit zur Manifestation von Schwerhörigkeit in „mtDNA-mutator“-Mäusen beizutragen.

Eine Untersuchung der Anzahl der mtDNA-Kopien in den „mtDNA-mutator“-Mäusen zeigte einen Anstieg im Vestibularsystem auf das sechsfache und in der Cochlea auf das 2,5-fache im Vergleich zu Kontrolltieren. In allen Tieren korrelierte die Anzahl der mtDNA-Moleküle positiv mit der Anzahl der Deletionen. Dies ist im Einklang mit den Daten von Kim et al., welche einen 27 %igen Anstieg der Anzahl der mtDNA-Kopien im Innenohr von 17 Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen zeigen konnten (Kim et al., 2019).

Zusammenfassend zeigte sich kein klarer vestibulärer Phänotyp bei der Untersuchung der gealterten „mtDNA-mutator“-Mäuse. Ein möglicher Kompensationsmechanismus der sich mit dem Alter anhäufenden Deletionen der mtDNA ist die Erhöhung der Kopienzahl der mtDNA-Moleküle, was im Vestibularsystem ausgeprägter zu sein scheint als in der Cochlea.

5.1.2 Verstärkte Apoptose trotz fehlendem oxidativem Stress und strukturellen Veränderungen

Strukturelle Veränderungen

Bei der Auswertung der HE- und Nissl-Färbung des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Mäuse konnten bei den homozygoten Mäusen keine strukturellen Veränderungen nachgewiesen werden. In der Cochlea dagegen ist beschrieben, dass es bei neun Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen zu einem Verlust innerer und äußerer Haarzellen kommt, sowie zum Verlust von Neuronen des Spiralganglions (Niu et al., 2007; Someya et al., 2008). Bei Studien an menschlichen Felsenbeinen von schwerhörigen Patienten mit einer mtDNA-Mutation zeigt sich eine Degeneration der Stria vascularis, der cochleären Haarzellen und der Spiralganglionzellen (Lindsay and Hinojosa, 1976; Takahashi et al., 2003), sowie des vestibulären Systems, wobei vor allem der Sacculus betroffen ist (Koda et al., 2010).

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für den fehlenden Nachweis einer strukturellen Veränderung in der vorliegenden Studie. Im vestibulären System konnte im Vergleich zum cochleären System eine stärkere Erhöhung der mtDNA-Kopien nachgewiesen werden (siehe 1.8.2), was einen möglichen Kompensationsmechanismus darstellt. In den vestibulären Zellen scheint diese mitochondriale Kompensation besonders ausgeprägt zu sein. Zudem bestehen „Aufräummechanismen“, sodass eine beginnende Degeneration von einzelnen Zellen womöglich noch nicht sichtbar war und somit der Zeitpunkt der Untersuchung nicht richtig gewählt war. Des Weiteren kann die fehlende Degeneration auch methodisch bedingt sein. Möglicherweise sind genauere histologische Methoden oder eine stereologische Analyse nötig, um eine vorhandene Degeneration zu detektieren. Zudem gibt es bezüglich des Verlusts der cochleären Haarzellen in alten „mtDNA-mutator“-Mäusen widersprüchliche Daten. So beschrieben Someya et al. einen schweren Verlust der inneren und äußeren Haarzellen (Someya et al., 2008), wohingegen in zwei anderen Studien kein signifikanter Verlust der inneren und äußeren Haarzellen der Cochlea in alten „mtDNA-mutator“-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Kim et al., 2019; Niu et al., 2007). Ein Verlust der Neurone des Spiralganglions wurde dahingegen von allen Gruppen beschrieben. Dies deutet darauf hin, dass erst im zweiten Neuron eine Degeneration klar zu detektieren ist. Somit sind Studien des Ganglion ves-

tibuli, sowie möglicherweise auch der Vestibulariskerne anzuschließen, um das vestibuläre System der gealterten „mtDNA-mutator“-Mäuse vollständig bezüglich einer vorliegenden Degeneration zu untersuchen.

Oxidativer Stress und Apoptose

Um eine Fehlfunktion auf physiologischer Ebene, welche nicht mit einer strukturellen Veränderung einhergeht, darzustellen, erfolgten weitere Untersuchungen zu oxidativem Stress und Apoptose. Eine Belastung mit oxidativem Stress konnte anhand einer 8-OHdG-Färbung nicht gezeigt werden. Das Fehlen von oxidativem Stress und ROS wurde schon von anderen Geweben, wie Herz und Leber, berichtet (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2005). In der Cochlea erfolgten bisher keine dahingehenden Studien (Han and Someya, 2013). Interessanterweise konnte jedoch Apoptose in diesen Geweben nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Anzahl der apoptotischen Zellen mit Hilfe einer TUNEL-Färbung im Vestibularsystem der Mutanten hat einen Anstieg dieser gezeigt, was im Einklang mit Daten von Kujoth et al., Someya et al. und Niu et al. in der Cochlea ist (Kujoth et al., 2005; Niu et al., 2007; Someya et al., 2008). Diese Erkenntnis, sowie die Tatsache, dass sich in den „mtDNA-mutator“-Mäusen die Mutationen der mtDNA linear akkumulieren (Trifunovic et al., 2004), deutet darauf hin, dass der angenommene „Teufelskreis“ der mitochondrialen Theorie des Alterns bei den „mtDNA-mutator“-Mäusen nicht stattfindet. Als Auslöser der Apoptose scheint also nicht ein vermehrter oxidativer Stress verantwortlich zu sein, sondern andere Mechanismen.

Auswirkung der Deletionen auf die Atmungskettenproteine

Das auditorische System der „mtDNA-mutator“-Maus wurde bis jetzt nur auf strukturelle Schädigungen und Apoptose untersucht. In dieser Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen der mitochondrialen Dysfunktion auf die Atmungskettenkomplexe mittels einer semiquantitativen Methode durch Antikörpermarkierung der Atmungskettenkomplexe im Innenohr untersucht. Die immunhistochemische Färbung des Komplex I zeigte keinen Unterschied zwischen den homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen. Bei der Färbung von Komplex IV ergab sich ein leichter Trend ($p = 0,13$) in Richtung einer Verminderung der Intensität der Färbung bei den homozygoten „mtDNA-

mutator“-Mäusen. Dies lässt eine geringe Störung der Atmungskette der homozygoten „mtDNA-mutator“-Mäusen vermuten.

In anderen Geweben, wie z. B. Skelettmuskel, Kardiomyozyten und Gehirn, wurde die Doppelfärbung für Cytochrom-c-Oxidase (COX, Komplex IV) und Succinat-Dehydrogenase (SDH, Komplex II) durchgeführt (Ahlqvist et al., 2012; Trifunovic et al., 2004; Vermulst et al., 2008). Bei dieser Färbung werden die mitochondrial kodierten katalytischen Untereinheiten der COX braun angefärbt, die nukleär kodierten Untereinheiten der SDH stellen sich dunkelblau dar. Dies verbessert die Darstellung der COX-negativen Zellen und macht somit im Gegensatz zur verwendeten immunhistochemischen Methode eine verbesserte quantitative Auswertung möglich. Diese Färbung kann nur auf Kryo-Schnitten angewandt werden. Da das Felsenbein der härteste Knochen des Körpers ist, können von diesem Gewebe keine Kryo-Schnitte angefertigt werden, weshalb auch die COX/SDH-Doppelfärbung nicht durchgeführt werden konnte.

In der „mtDNA-mutator“-Maus wurde mittels der COX/SDH-Doppelfärbung eine Störung der Atmungskette in Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen gezeigt (Trifunovic et al., 2004; Vermulst et al., 2008). In Studien an neuronalen Zellen lagen jedoch keine COX-negativen Neurone vor (Ahlqvist et al., 2012). Es zeigte sich lediglich eine geringe Reduktion der Proteine des Komplex I und Komplex IV im Gehirn der „mtDNA-mutator“-Mäuse. Auch in Leber- und Herzmuskelzellen von gealterten „mtDNA-mutator“-Mäusen zeigte sich eine unbeeinträchtigte mitochondriale Proteinsynthese (Edgar et al., 2009). Jedoch war die Stabilität mehrerer Atmungskettenkomplexe trotz normaler Synthese der entsprechenden mtDNA-kodierten Untereinheiten stark beeinträchtigt. Dies lässt vermuten, dass die durch Punktmutationen ausgelöste Substitution von einzelnen Aminosäuren in Untereinheiten der Atmungskette zu einer Störung der Atmungskette führt. In der hier verwendeten immunhistochemischen Färbung detektieren die Antikörper funktionelle, sowie defekte Proteine. Somit könnte der Anteil der biochemisch intakten Atmungskettenkomplexe geringer sein, als durch die Färbung angenommen wird. Um eine Störung der Atmungskette im Innenohr der „mtDNA-mutator“-Mäuse weiter zu untersuchen, müssten auch hier funktionelle Studien angeschlossen werden, wie z. B. die Bestimmung des ATP-Gehalts in den Zellen.

Eine andere Ursache für den geringen Unterschied der Proteinmenge der Atmungskettenkomplexe zwischen den „mtDNA-mutator“-Mäusen und Wildtyp-Mäusen könnte auch sein, dass in den 13 Monate alten Mäusen der kritische Schwellenwert nicht, bzw. noch nicht, erreicht ist. Zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen lässt sich vermuten, dass postmitotische Gewebe wie Neurone die zufällige mtDNA-Mutagenese gut kompensieren und die Funktion der Atmungskette aufrechterhalten können.

Um einen weiteren Einblick über Gegenregulationsmechanismen in Folge der mitochondrialen Mutationen zu bekommen, wurde zudem eine Genexpressionsanalyse des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Mäuse durchgeführt.

5.1.3 Kompensationsmechanismen durch Aktivierung regulativer Signalwege

Die Genexpressionsanalyse aus Homogenaten des explantierten vestibulären Systems der 13 Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäuse zeigte differentiell regulierte Signalwege, welche an der Steuerung von Apoptose und mitochondrialen Reparaturmechanismen beteiligt sind. Diese Analyse erbrachte eine signifikante Anreicherung differentiell regulierter Gene im „Ataxia Telangiectasia Mutated“ (ATM)-Signalweg, über welchen einerseits Reparaturproteine der DNA aktiviert werden, sowie auch bei irreparablen Schäden Apoptose ausgelöst wird (Shiloh and Ziv, 2013). Mutationen im ATM-Gen führen zum Louis-Bar-Syndrom (auch Ataxia teleangiectatica), welches sich durch eine zerebelläre Ataxie, Teleangiektasien, eine Immundefizienz, eine erhöhte Inzidenz maligner Tumoren sowie Störungen der körperlichen und geistigen Entwicklung äußert (Rothblum-Oviatt et al., 2016).

Da Veränderungen in den Reaktionsmechanismen auf DNA-Schäden Kennzeichen von Krebs sind, wurde der ATM-Signalweg in verschiedenen Krebsarten umfassend untersucht (Jin and Oh, 2019). Im Nervensystem spielt ATM eine entscheidende Rolle, da das ausgeprägteste Merkmal von Patienten mit Louis-Bar-Syndrom eine schwere und fortschreitende Neurodegeneration ist. Studien an ATM-defizienten Mäusen zeigten zwar keine zerebelläre Degeneration, jedoch hat die genaue Untersuchung anderer Aspekte des Nervensystems auf eine Fehlfunktion des nigrostriatalen Signalwegs hingewiesen, sowie eine al-

tersabhängige Verminderung der dopaminergen Neurone ergeben (Shiloh and Ziv, 2013).

Doch auch mitochondriale Reparaturmechanismen werden über diesen Signalweg vermittelt. Der Mitochondrientransfer und die interzelluläre Signaltransduktion als Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche werden maßgeblich durch die Aktivität von ATM reguliert (Jin and Cordes, 2019). So gibt es in ATM-defizienten Zellen Hinweise auf eine Fehlfunktion der Mitochondrien. In Thyrozyten führt eine ATM-Defizienz zu vermehrten dysfunktionalen Mitochondrien, erhöhtem oxidativem Stress und verminderter Mitophagie (Valentin-Vega et al., 2012). Ein Teil des ATM-Proteins ist in den Mitochondrien lokalisiert und wird durch eine mitochondriale Dysfunktion aktiviert.

Im Innenohr, sowie in der „mtDNA-mutator“-Maus, wurde der ATM-Signalweg bisher noch nicht untersucht. Die vorliegende Studie weist darauf hin, dass auch im Innenohr durch eine Aktivierung von ATM, welche möglicherweise durch die mitochondriale Dysfunktion der „mtDNA-mutator“-Mäuse ausgelöst wird, Reparaturmechanismen vermittelt werden.

Des Weiteren wurde eine differentielle Regulation des Proteinkinase-A (PKA)-Signalwegs detektiert. Dieser ist an der Regulation des Energiestoffwechsels und der zellulären Reaktion auf metabolischen Stress beteiligt. Im Zellkern aktiviert die PKA das „cAMP response element-binding protein“ (CREB), worüber die Transkription von überlebensfördernden Genen aktiviert wird (De Cesare and Sassone-Corsi, 2000). Zudem kann die PKA pro-apoptotische Proteine wie „Bcl2-associated agonist of cell death“ (Bad) inaktivieren und somit Apoptose regulieren (del Peso et al., 1997). Über den PKA-Signalweg werden auch verschiedene mitochondriale Funktionen reguliert (Ould Amer and Hebert-Chatelain, 2018). Die Aktivierung des Signalweges kann vom Zytosol oder direkt in den Mitochondrien ausgelöst werden. Unter anderem ist die PKA-abhängige Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe ein wichtiger und direkter Weg, um die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) zu regulieren.

In kultivierten postnatalen Neuronen des Spiralganglions von Ratten wurde gezeigt, dass die über cAMP-vermittelte Aktivierung der PKA positive Effekte auf das Überleben der Neurone hat (Bok et al., 2003). Auch auf cochleäre Haarzellen wurde bereits ein PKA-vermittelter schützender Effekt gezeigt. Cisplatin-induzierte Ototoxizität kann durch Forskolin (FSK), ein Stimulator der

Adenylatzyklase, positiv beeinflusst werden. FSK hemmte die Aktivierung des mitochondrialen apoptotischen Weges sowie die Produktion von ROS. Als vermittelnde Signalwege wurde der PKA- und MAPK-Signalweg identifiziert (Guo et al., 2018). Über den PKA-Signalweg werden somit möglicherweise als Reaktion auf die mitochondriale Störung der „mtDNA-mutator“-Maus Kompensationsmechanismen, wie die Regulation von Apoptose, vermittelt. Neben der Cochlea scheint auch im vestibulären System der PKA-Signalweg aktiv zu sein und protektive Effekte zu vermitteln.

Durch die vorliegende Genexpressionsanalyse wurden Signalwege, die verschiedene Kompensationsmechanismen vermitteln, detektiert. In der Cochlea von neun Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäusen waren zugehörige Gene von Signalwegen, welche Apoptose und Reaktionen auf Stress steuern, vermehrt exprimiert (Someya et al., 2008). Zudem waren Gene, welche am Energiestoffwechsel beteiligt sind, herunterreguliert, was mit einer mitochondrialen Dysfunktion und der damit verbundenen Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels vereinbar ist. Somit scheinen im vestibulären System und in der Cochlea verschiedene Reaktionsmechanismen durch die mitochondriale Störung ausgelöst zu werden.

Zusammenfassung der Charakterisierung des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Maus

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das vestibuläre System der „mtDNA-mutator“-Maus charakterisiert. Trotz eines deutlichen Alterungsphänotyps und vermehrten Deletionen zeigte sich kein klarer vestibulärer Phänotyp. Histologisch konnte keine Degeneration der vestibulären End-Strukturen sowie immunhistochemisch keine Veränderung der Atmungskettenproteine detektiert werden. Obwohl zudem kein oxidativer Stress nachgewiesen werden konnte, zeigte sich vermehrt Apoptose. Als mögliche Kompensationsmechanismen der mitochondrialen Störung im vestibulären System der „mtDNA-mutator“-Maus konnte eine Erhöhung der Kopienzahl der mtDNA aufgezeigt werden. Zudem wurden mittels einer Mikroarray-basierten Genexpressionsanalyse Signalwege ermittelt, welche Reparaturmechanismen vermitteln und Apoptose regulieren. Letztendlich scheint der Effekt der mitochondrialen Störung durch mtDNA-Mutationen in cochleären Neuronen stärker als in vestibulären sensorischen

Neuronen zu sein. Dies mag mit einem unterschiedlichen Energiebedarf oder effizienteren zellulären Kompensationsmechanismen zusammenhängen.

Um mögliche therapeutische Ansätze zu prüfen, wurde mit dem Utrikelmodell untersucht, ob AICAR und Bezafibrat auf Expressionsebene die Utrikelfunktion beeinflussen können.

5.2 Pharmakologische Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese in „Utrikel-Explants“

Durch die Etablierung der „Utrikel-Explants“ war es möglich, in vitro eine pharmakologische Intervention zu testen. Die Kultivierung von „Utrikel-Explants“ und die Möglichkeit der Durchführung vielfältiger Studien daran, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht (Loponen et al., 2011; Werner et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode neu in der Arbeitsgruppe etabliert. Mit Hilfe der DAPI- und Phalloidin-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Utrikel bei der sorgfältigen Präparation nicht beschädigt werden und es durch die Kultur zu keiner strukturellen Veränderung kommt. Der LIVE/DEAD®-Assay ermöglichte zudem die Untersuchung, ob die Zellen der „Utrikel-Explants“ durch die Kultur absterben, was nur in geringem Ausmaß der Fall war.

Mittels einer Genexpressionsanalyse konnten die genaueren Mechanismen einer pharmakologischen Intervention auf Expressionsebene untersucht werden. Die durch eine Microarray-basierte Analyse gewonnenen Daten weisen jedoch auch Einschränkungen auf. Die Untersuchung in ganzen Geweben spiegelt das Vorhandensein verschiedener Zelltypen wider und ist daher komplex. Zudem führen Veränderungen des mRNA-Spiegels nicht immer zu einer Veränderung des Proteinspiegels. Im Gegensatz zu einer Genexpressionsanalyse aus Homogenaten des Innenohres, konnte durch die Präparierung des Utrikels eine gezielte Analyse eines vestibulären Endorgans erfolgen.

5.2.1 AICAR regt in Utrikeln der Wildtyp-Mäuse die mitochondriale Biogenese sowie proliferative Signalwege an

Diese Arbeit untersucht erstmals den Effekt von AICAR auf das Innenohr bzw. das vestibuläre System. Wie schon von anderen Geweben berichtet (Kobilo et al., 2014; Viscomi et al., 2011; Winder et al., 2000), scheint der AMPK-Aktivator AICAR auch in den „Utrikel-Explants“ die mitochondriale Biogenese anzuregen.

So zeigten sich bei der Signalweganalyse der Microarraydaten der AMPK-Signalweg und der PPAR-Signalweg differentiell reguliert. Daneben zeigten sich Signalwege differentiell reguliert, welche den Kategorien Zellwachstum und Entwicklung zugeordnet werden können, wie der MAPK-, der PI3K/Akt-, der NFAT-, der Thrombin- und der PDGF-Signalweg.

Hypertrophe Signale werden über verschiedene Signalwege vermittelt. Diese beinhalten den MAPK-, den PI3K/Akt- und den Calcineurin-NFAT-Signalweg (Rohini et al., 2010), welche abhängig vom Zelltyp und Aktivator zum Überleben von Zellen beitragen (Brunet et al., 2001). Es ist bereits bekannt, dass AICAR eine Kaskade des MAPK-Signalwegs, die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade, beeinflusst (Chen et al., 2002; Kim et al., 2001). Im Innenohr wurde gezeigt, dass der H-Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg an der Förderung des Überlebens der cochleären Haarzellen beteiligt ist (Battaglia et al., 2003), wie auch der PI3K/Akt-Signalweg (Chung et al., 2006). Zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen scheint AICAR auch in den „Utrikel-Explants“ den PI3K/Akt-Signalweg zu aktivieren, was auf einen neuroprotektiven Effekt auf das vestibuläre Gewebe hinweist.

Der Calcineurin-NFAT-Signalweg ist ein weiterer Signalweg, welcher hypertrophe Signale vermittelt. In Neuronen spielt NFAT eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems (Nguyen and Di Giovanni, 2008) sowie der Regulation des Überlebens oder Sterbens von Zellen (Benedito et al., 2005). Die Expression von NFAT schützt Neurone vor Apoptose, wobei ein gegensätzlicher Effekt von NFATc3 und NFATc4 auf neuronale Apoptose beobachtet wurde. Dies ist möglicherweise auf einen weiteren, calciumunabhängigen Regulationsmechanismus zurückzuführen (Mojsa et al., 2015).

Zudem war der „Platelet-derived growth factor“ (PDGF)-Signalweg differentiell reguliert, welcher wichtig ist für die Zellproliferation (siehe Abbildung 5-1). Bei der Untersuchung von verschiedenen Wachstumsfaktoren an Utrikeln postnataler Ratten hatte PDGF keinen Effekt auf die Zellproliferation (Zheng et al., 1997). Allerdings führte die Blockierung des PDGF-R- β zur Apoptose der Haarzellen bei neonatalen Mäusen. Somit scheinen Signale über PDGF-R- β für das Überleben der Haarzellen im Innenohr nötig zu sein (Hayashi et al., 2008).

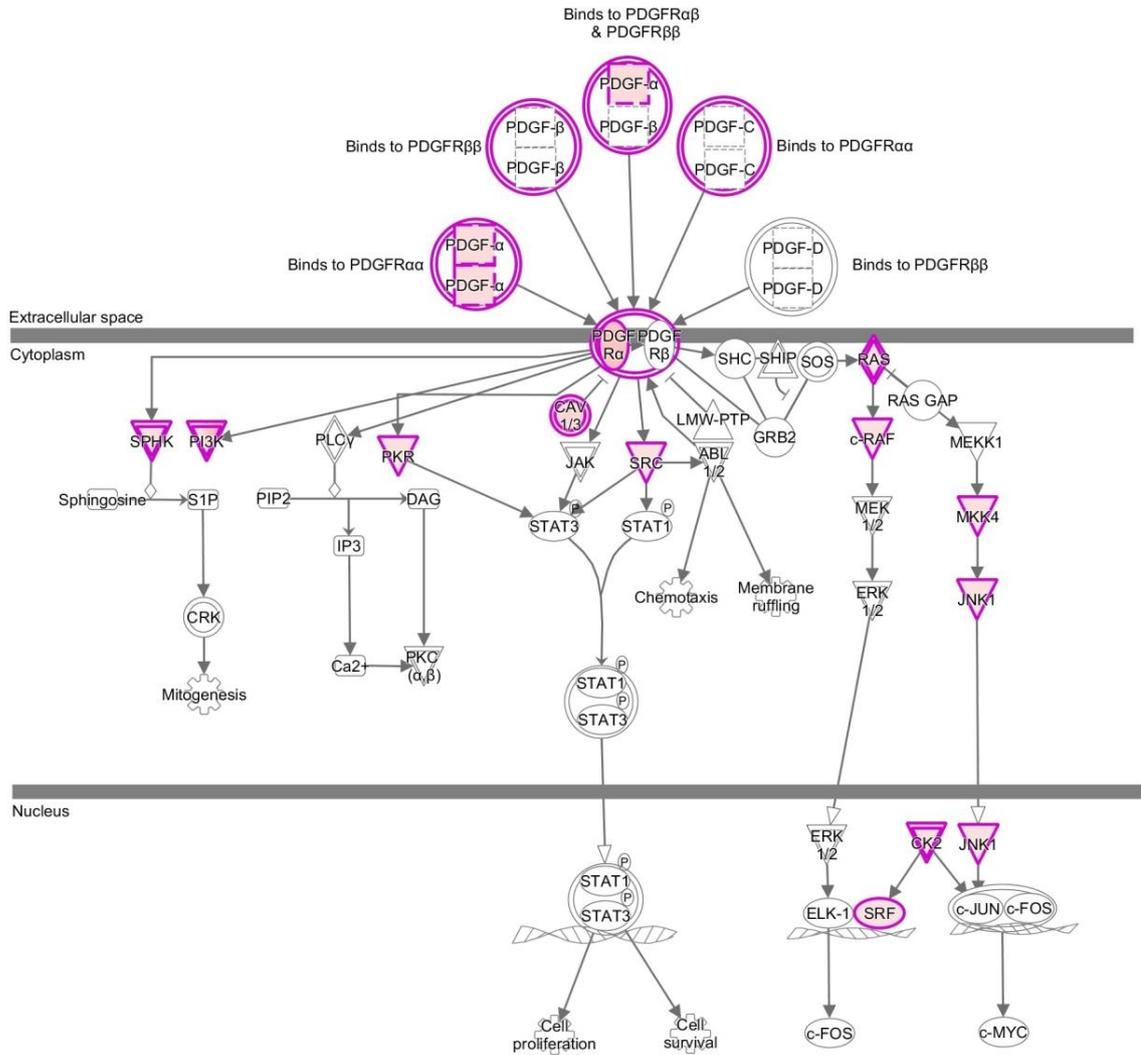


Abbildung 5-1: „Platelet-derived growth factor“ (PDGF)-Signalweg. © QIAGEN. Die Homo- oder Heterodimere der PDGF binden an jeweils zwei Rezeptoren, wodurch es zur Autophosphorylierung dieser kommt. Dadurch werden weitere Signalwege aktiviert, wie z. B. der PI3K-, der JAK/STAT-Signalweg und die RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade. Diese vermitteln unter anderem Signale zur Stimulation des Zellwachstums und Inhibierung von Apoptose. Differenziell regulierte Gene *lila* eingefärbt.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten also bereits zeigen, dass AICAR in einer Vielzahl von Geweben über die AMPK und proliferative Signalwege protektive Signale vermittelt. Auch neuroprotektive Effekte wurden beschrieben. Diese Arbeit zeigt, dass AICAR auch in den Utrikeln einen positiven Effekt ausübt und die Haar- und Stützzellen vor Apoptose zu schützt.

5.2.2 Bezafibrat wirkt auf Utrikel über verschiedene Signalwege neuroprotektiv

Bei der Signalweganalyse der Microarraydaten der Utrikel, welche mit Bezafibrat behandelt wurden, zeigten sich Signalwege differentiell reguliert, welche das Zellwachstum regulieren, antioxidative Effekte vermitteln sowie die mitochondriale Biogenese beeinflussen. Über den Wnt/Ca⁺-Signalweg werden Transkriptionsfaktoren wie NFAT und CREB aktiviert. Durch den PPAR-Signalweg und den Signalweg „Mitochondrial Dysfunction“ zeigte sich eine Aktivierung der mitochondrialen Biogenese.

Antioxidative Effekte werden über den Glutathion-Signalweg durch Aktivierung der Glutathion Peroxidase 3 (GPX3) vermittelt. Der protektive Effekt der GPX3 im zentralen Nervensystem wurde bereits beschrieben. In einem Modell für zerebrale Ischämie wurde ein Anstieg der Antioxidantien SOD1 und GPX3 beobachtet, wodurch es nicht zur Apoptose der kortikalen Neurone kam (Merino et al., 2014). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen scheint GPX3 einen schützenden Effekt zu vermitteln. In Neuronen der lateralen Substantia Nigra, welche bei Morbus Parkinson schneller untergehen, als die der medialen Substantia Nigra, war GPX3 weniger exprimiert im Vergleich zu den Neuronen der medialen Substantia Nigra (Duke et al., 2007). Somit scheint Bezafibrat auch eine antioxidative Wirkung zu haben.

Wie schon durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit AICAR zeigten sich durch die Behandlung mit Bezafibrat Signalwege differentiell reguliert, welche die Zellproliferation anregen. Unter dem Namen „Prostate Cancer Signaling“ werden verschiedene Signalwege zusammengefasst, wie der PI3K/Akt- und der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg. Neben den bereits oben beschriebenen Funktionen aktiviert der PI3K/AKT-Signalweg über die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) CREB sowie über die I κ B Kinase den „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF- κ B). Über den Wnt/Ca⁺-Signalweg wird NFAT sowie ebenfalls CREB und NF- κ B aktiviert (siehe Abbildung 5-2).

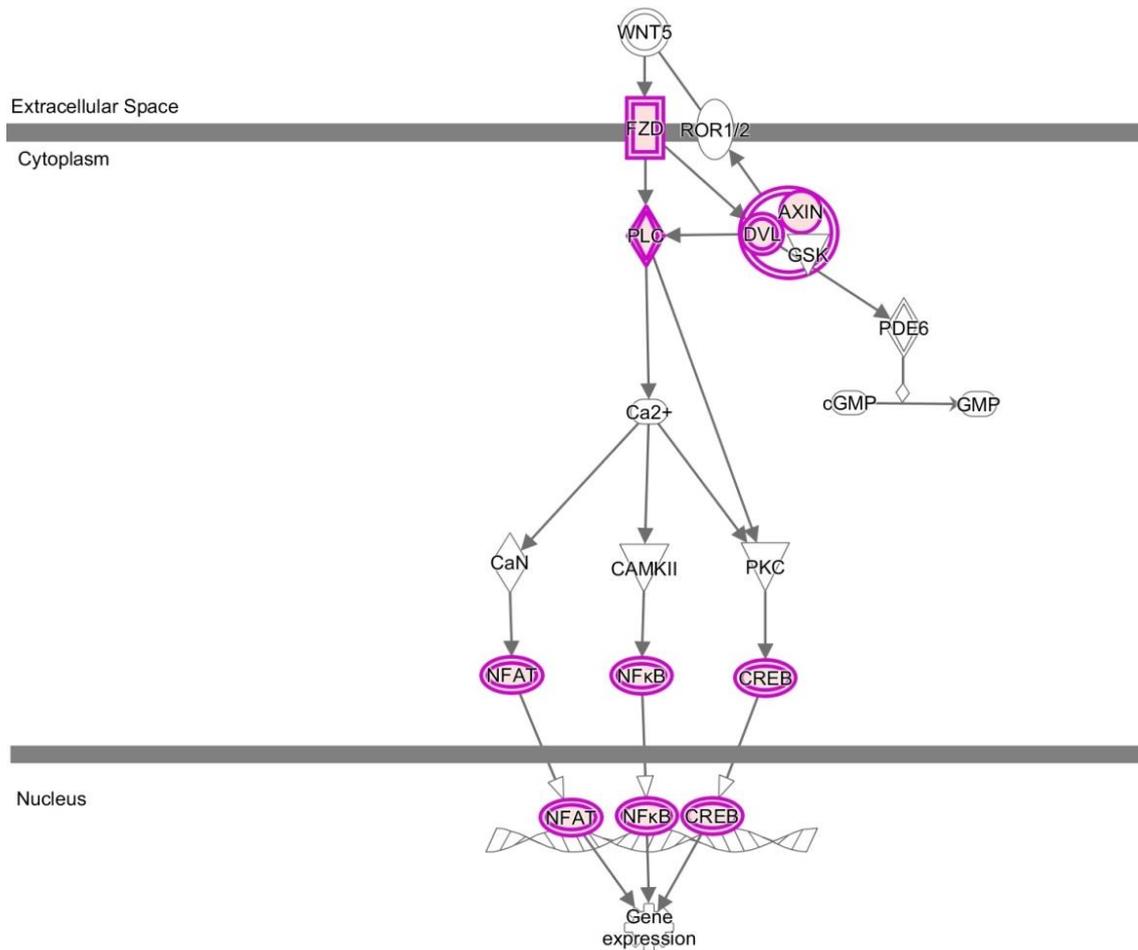


Abbildung 5-2: Wnt/Ca⁺-Signalweg. © QUIAGEN. Über den Wnt/Ca⁺-Signalweg werden Transkriptionsfaktoren wie „Nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT), „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF-κB) und „cAMP response element-binding protein“ (CREB) aktiviert, welche wiederum die Genexpression verschiedener Genen aktivieren. Differenziell regulierte Gene lila eingefärbt.

Der Transkriptionsfaktor CREB besitzt viele verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Geweben. Im Nervensystem ist CREB wichtig für die Entwicklung, die synaptische Plastizität und die Vermittlung neuroprotektiver Effekte. Diese werden über die Aktivierung der Transkription von Neurotrophinen, wie dem „Brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) und dem „Insulin-like growth factor 1“ (IGF-I), sowie anderen anti-apoptischen Genen beeinflusst (Fukuchi et al., 2005; Lambert et al., 2001). Im Einklang damit führt die Inhibierung von CREB zur Apoptose neuronaler Zellen (Ao et al., 2006). Zudem schützt CREB Neurone vor oxidativem Stress, unter anderem über die Aktivierung der Hämoxygenase-1 (Kronke et al., 2003). Interessanterweise reguliert CREB weitere antioxidative Gene über die Expression von PGC-1α (Herzig et al., 2001).

Im Innenohr ist BDNF wichtig für das Überleben der Neurone des Spiralganglions. Es wurde gezeigt, dass CREB essentiell für die kontinuierliche Expression von BDNF ist (Zha et al., 2001). Zudem korreliert der Untergang der Neurone des Spiralganglions nach Deafferation mit einer Verminderung von phosphoryliertem CREB (Alam et al., 2007). Dies lässt auf eine neuroprotektive Wirkung von CREB im Innenohr schließen.

Zusammenfassend scheint Bezafibrat über bereits bekannte Signalwege die mitochondriale Biogenese in verschiedenen Geweben einschließlich des Nervensystems zu regulieren. Dadurch werden antioxidative und neuroprotektive Signale vermittelt. Die Genexpressionsanalyse zeigte zudem Signalwege, welche bisher nicht mit Bezafibrat in Verbindung gebracht wurden und die Zellproliferation anregen. Diese haben auch in bisherigen Studien eine neuroprotektive Wirkung zeigen können.

Im Unterschied zur Behandlung der Utrikel der Wildtyp-Mäuse mit AICAR zeigten sich durch die Behandlung mit Bezafibrat weniger Gene signifikant reguliert (555 vs. 1386 signifikant regulierte Gene). Dementsprechend sind auch weniger Signalwege signifikant differentiell reguliert (31 vs. 114 signifikant differentiell regulierte Signalwege). Die durch die Behandlung mit AICAR oder Bezafibrat differentiell regulierten Signalwege können weitestgehend ähnlichen Funktionen und Kategorien zugeordnet werden, wie Zellwachstum und Entwicklung. Zudem zeigte sich bei beiden Substanzen eine Aktivierung der mitochondrialen Biogenese. Dies scheint durch AICAR deutlicher ausgeprägt zu sein. Durch die Behandlung mit Bezafibrat werden dagegen vermehrt Signalwege aktiviert, welche Apoptose regulieren und antioxidativ wirken.

5.2.3 AICAR übt auf „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Maus eine antiapoptotische Wirkung aus

Es liegen bislang keine Studien zum Effekt von AICAR auf die „mtDNA-mutator“-Maus vor, weshalb diese Genexpressionsanalyse neue Einblicke verschafft. Es zeigten sich Signalwege differentiell reguliert, welche die mitochondriale Biogenese anregen, wie der Signalweg „PPAR α /RXR α Activation“. Der AMPK-Signalweg war jedoch nicht signifikant reguliert. Vermehrt waren dahingegen Signalwege aktiviert, welche Zellwachstum und Apoptose steuern. Verschiedene Signalwege, wie der „Prostate Cancer“-Signalweg, der Calcium-

5 Diskussion

Signalweg und „CREB Signaling in Neurons“ aktivieren den Ras/Raf/MEK/ERK- und den PI3K/Akt-Signalweg (siehe Abbildung 5-3).

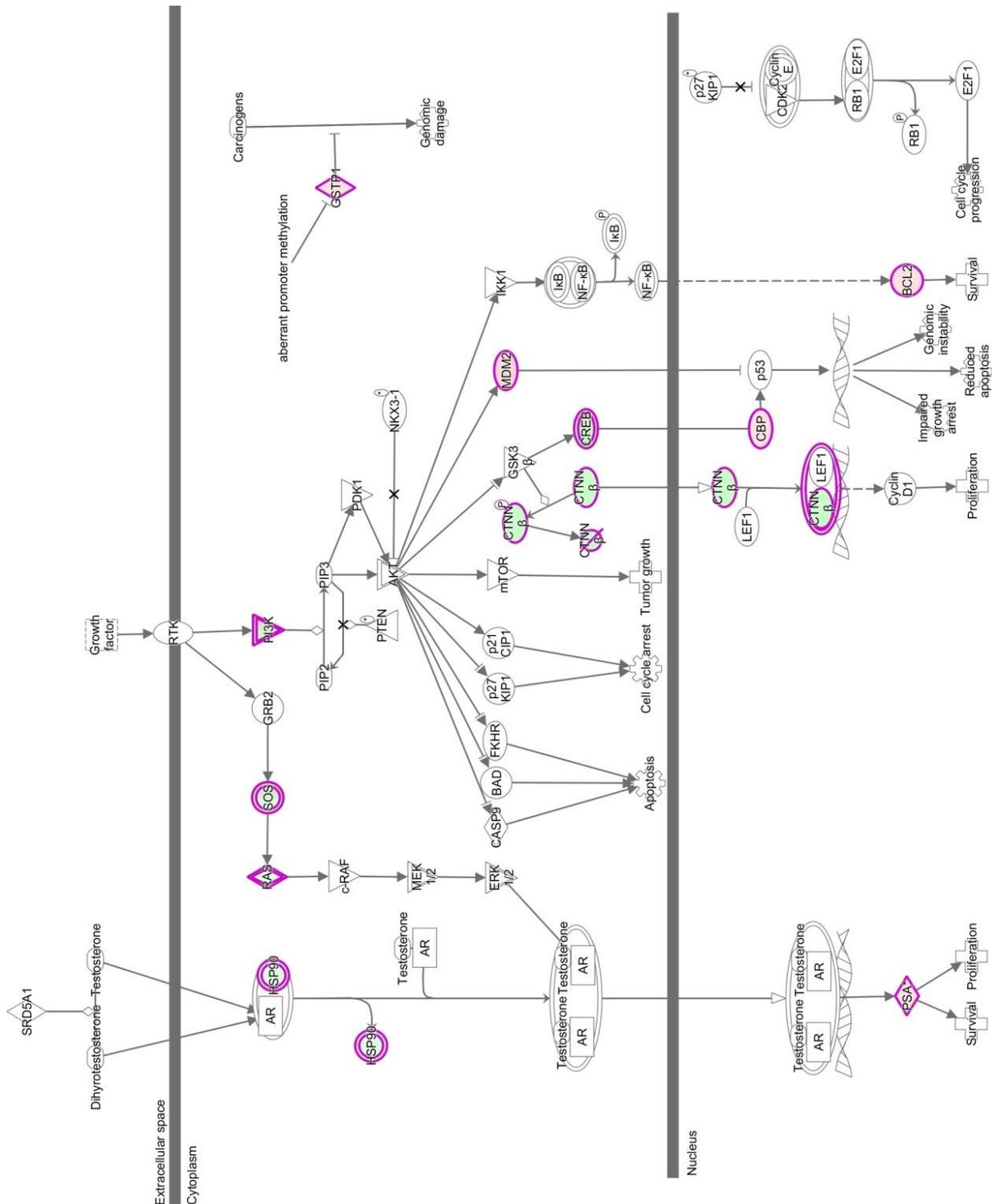


Abbildung 5-3: „Prostate Cancer Signaling“. © QIAGEN. Differentielle Regulation von Genen des Ras/Raf/MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalweges, wodurch Transkriptionsfaktoren wie CREB und NF κ B aktiviert werden. Differentiell regulierte Gene lila und grün eingefärbt.

Über diese Signalwege, sowie über weitere Signalkaskaden, werden Transkriptionsfaktoren wie CREB und NF κ B aktiviert. Wie bereits dargestellt, vermitteln diese proliferative, sowie auch neuroprotektive Effekte. Die Regulation der Expression von CREB durch AICAR wurde bereits beschrieben. Eine Aktivierung der AMPK über AICAR führte in Skelettmuskelzellen zu einer Aktivierung von CREB (Thomson et al., 2008). Auch in den vestibulären Haar- und Stützzellen scheint somit ein möglicher Mechanismus zur Verhinderung von Apoptose die Aktivierung von CREB über AICAR zu sein.

Der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert über NF κ B das antiapoptotische Protein Bcl-2. Es wurde bereits ein positiver Effekt auf das Überleben von Haarzellen im Innenohr durch Bcl-2 beschrieben. Nach Neomycin-Behandlung von Utrikeln Bcl-2 überexprimierender Mäuse, kam es zu vermindertem Absterben der Haarzellen (Cunningham et al., 2004). Auch in Zellkulturen cochleärer Haarzellen und von Neuronen des Spiralganglions konnte durch Gentransfer von Bcl-2 mittels eines Adenovektors ein signifikant besseres Überleben der Haarzellen nach Behandlung mit Neomycin oder Cisplatin nachgewiesen werden (Staecker et al., 2007).

Es zeigte sich durch die Behandlung der Utrikel der „mtDNA-mutator“-Mäuse mit AICAR über verschiedene Signalwege eine Aktivierung antiapoptotische Faktoren, welche bereits in vestibulären und cochleären Zellen untersucht wurden. Die Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese war dagegen weniger deutlich. Die Veränderung der Genexpression durch die Behandlung mit AICAR war bei den Utrikeln der „mtDNA-mutator“-Mäusen geringer ausgeprägt, als bei den mit AICAR behandelten Utrikeln der Wildtyp-Mäuse. Dies kann daran liegen, dass die „mtDNA-mutator“-Mäuse etwas älter waren und/oder an der niedrigeren Fallzahl der Studie. Eine Aktivierung der mitochondrialen Biogenese zeigte sich nur über PPAR α . Über den AMPK-Signalweg lag keine signifikante differentielle Regulation in den Utrikeln der „mtDNA-mutator“-Mäuse durch AICAR vor, wie sie bei den Utrikeln der Wildtyp-Mäuse zu sehen war. Bei der „mtDNA-mutator“-Maus waren vorrangig Signalwege differentiel reguliert, die Zellwachstum und Apoptose steuern.

Zusammenfassung der pharmakologischen Intervention

Nachdem im ersten Teil die Charakterisierung des vestibulären Systems der „mtDNA-mutator“-Mäuse nur geringe Auswirkungen der mitochondrialen Stö-

rung durch mtDNA-Mutationen zeigte, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit als Zellkultur-Methode die „Utrikel-Explants“ etabliert. Hierdurch wurde die In-vitro-Testung einer pharmakologischen Intervention ermöglicht. Durch die Behandlung mit AICAR und Bezafibrat konnte durch eine Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse eine differentielle Regulierung von Signalwegen, welche die mitochondriale Biogenese regulieren, wie dem AMPK- und dem PPAR-Signalweg, detektiert werden. Zudem lag eine Aktivierung von Signalwegen vor, welche proliferative und antiapoptotische Signale vermitteln. Im Vergleich zu Bezafibrat zeigten sich durch die Behandlung mit AICAR mehr Signalwege differentiell reguliert. Eine Überlegenheit von AICAR oder Bezafibrat konnte jedoch nicht festgestellt werden. Insgesamt können die durch die Behandlung mit AICAR oder Bezafibrat differentiell regulierten Signalwege weitestgehend ähnlichen Funktionen und Kategorien zugeordnet werden, wie Zellwachstum und Entwicklung.

Die Behandlung von „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Maus zeigte eine Aktivierung von Signalwegen, welche die mitochondriale Biogenese anregen. Im Vergleich zu den mit AICAR behandelten Utrikeln der Wildtyp-Mäuse war dies jedoch weniger deutlich. Dagegen waren primär Signalwege aktiviert, welche Apoptose und Zellwachstum regulieren.

5.3 Ausblick

Im Gegensatz zum cochleären System zeigte sich im vestibulären System der „mtDNA-mutator“-Maus histologisch keine strukturelle Degeneration. Es ist nicht auszuschließen, dass strukturelle und funktionelle Veränderungen zu einem späteren Zeitpunkt (> 12 Monate) auftreten, weshalb Studien an älteren Mäusen durchzuführen sind. Zudem sind genauere histologische Studien sowie eine Untersuchung der vestibulären Ganglienzellen ergänzend notwendig. Zur besseren Differenzierung einer Störung der Atmungskette im Innenohr der „mtDNA-mutator“-Mäuse müssen ergänzend zur immunhistochemischen Untersuchung der Atmungskettenproteine funktionelle Studien angeschlossen werden, wie z. B. die Bestimmung des ATP-Gehalts in den Zellen.

Als möglicher Kompensationsmechanismus der mitochondrialen Störung konnte eine Erhöhung der Kopienzahl der mtDNA gezeigt werden. Interessant wäre auch eine Untersuchung der Deletionen und Kopienzahl in einzelnen Zellen,

nicht in Homogenaten des Innenohres. Dies ergäbe genauere Kenntnisse über die Mechanismen in den sensorischen Neuronen des vestibulären sowie des cochleären Systems. Mittels einer Mikroarray-basierten Genexpressionsanalyse aus Homogenaten des explantierten vestibulären Systems der 13 Monate alten „mtDNA-mutator“-Mäuse wurden Signalwege detektiert, welche Reparaturmechanismen vermitteln und Apoptose regulieren. Eine Aktivierung dieser Signalwege stellt einen weiteren therapeutischen Ansatz dar.

Die Etablierung der „Utrikel-Explants“ eröffnet eine Vielzahl an weiteren möglichen Studien. Zunächst sind die in der aktuellen Studie regulierten Signalwege genauer zu prüfen. Auch die Untersuchung einer höheren Anzahl an Utrikel der „mtDNA-mutator“-Mäuse, welche mit AICAR behandelt wurden, sind zur Validierung der bisherigen Ergebnisse nötig. Möglicherweise sind eine längere Behandlung oder in vivo Studien mit AICAR nötig, um im geschädigten Gewebe Veränderungen zu detektieren. Anschließend kann zudem eine Behandlung der Utrikel der „mtDNA-mutator“-Mäuse mit Bezafibrat erfolgen. An der „mtDNA-mutator“-Maus wurde bereits der Effekt von Bezafibrat getestet, jedoch nicht auf neuronales Gewebe. Die Gabe von Bezafibrat führte in der „mtDNA-mutator“-Maus zu einer Verbesserung des Alters-Phänotyps sowie zu einer Erhöhung von PGC-1 α in Leber und Milz (Dillon et al., 2012).

Zur weiteren Untersuchung einer pharmakologischen Intervention könnten andere Stoffe, welche die mitochondriale Biogenese anregen, in den hier etablierten „Utrikel-Explants“ getestet werden. Hierfür kommt Resveratrol, welches PGC-1 α über Sirt1 aktiviert in Frage. Zudem konnte gezeigt werden, dass Nikotinamid-Ribosid (NR), eine Vorstufe von NAD⁺, nachweislich die mitochondriale Biogenese induziert (Cerutti et al., 2014). Daneben können „Utrikel-Explants“ von verschiedenen Mausmutanten untersucht werden. Auch eine Behandlung der Utrikel mit ototoxischen Substanzen und Hypoxie kann neue Einblicke verschaffen.

Die Entstehung von Schwindel im Alter ist ein komplexer Prozess. Umso wichtiger ist es, Behandlungsmethoden zu finden, die Degenerationsprozessen im vestibulären System entgegenwirken. Die vorliegende Arbeit zeigt mögliche Ursachen und Interventionsmöglichkeiten mit Schwerpunkt auf die mitochondriale Genese einer vestibulären Störung im Alter.

Literaturverzeichnis

- Agrawal, Y., Carey, J.P., Della Santina, C.C., Schubert, M.C., Minor, L.B., 2009. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2004. *Arch Intern Med* 169, 938-944.
- Agrawal, Y., Zuniga, M.G., Davalos-Bichara, M., Schubert, M.C., Walston, J.D., Hughes, J., Carey, J.P., 2012. Decline in semicircular canal and otolith function with age. *Otol Neurotol* 33, 832-839.
- Ahlqvist, K.J., Hamalainen, R.H., Yatsuga, S., Uutela, M., Terzioglu, M., Gotz, A., Forsstrom, S., Salven, P., Angers-Loustau, A., Kopra, O.H., Tynnismaa, H., Larsson, N.G., Wartiovaara, K., Prolla, T., Trifunovic, A., Suomalainen, A., 2012. Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in Polg mutator mice. *Cell Metab* 15, 100-109.
- Alam, S.A., Robinson, B.K., Huang, J., Green, S.H., 2007. Prosurvival and proapoptotic intracellular signaling in rat spiral ganglion neurons in vivo after the loss of hair cells. *The Journal of comparative neurology* 503, 832-852.
- Ao, H., Ko, S.W., Zhuo, M., 2006. CREB activity maintains the survival of cingulate cortical pyramidal neurons in the adult mouse brain. *Molecular pain* 2, 15.
- Bai, U., Seidman, M.D., 2001. A specific mitochondrial DNA deletion (mtDNA4977) is identified in a pedigree of a family with hearing loss. *Hear Res* 154, 73-80.
- Bai, U., Seidman, M.D., Hinojosa, R., Quirk, W.S., 1997. Mitochondrial DNA deletions associated with aging and possibly presbycusis: a human archival temporal bone study. *The American journal of otology* 18, 449-453.
- Baloh, R.W., Jacobson, K.M., Socotch, T.M., 1993. The effect of aging on visual-vestibuloocular responses. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 95, 509-516.
- Baloh, R.W., Spain, S., Socotch, T.M., Jacobson, K.M., Bell, T., 1995. Posturography and balance problems in older people. *Journal of the American Geriatrics Society* 43, 638-644.
- Barmack, N.H., Fredette, B.J., Mugnaini, E., 1998. Parasolitary nucleus: a source of GABAergic vestibular information to the inferior olive of rat and rabbit. *The Journal of comparative neurology* 392, 352-372.

- Bastin, J., Aubey, F., Rotig, A., Munnich, A., Djouadi, F., 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor pathway stimulates the mitochondrial respiratory chain and can correct deficiencies in patients' cells lacking its components. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1433-1441.
- Battaglia, A., Pak, K., Brors, D., Bodmer, D., Frangos, J.A., Ryan, A.F., 2003. Involvement of ras activation in toxic hair cell damage of the mammalian cochlea. *Neuroscience* 122, 1025-1035.
- Benedito, A.B., Lehtinen, M., Massol, R., Lopes, U.G., Kirchhausen, T., Rao, A., Bonni, A., 2005. The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. *J Biol Chem* 280, 2818-2825.
- Blazquez, P., Partsalis, A., Gerrits, N.M., Highstein, S.M., 2000. Input of anterior and posterior semicircular canal interneurons encoding head-velocity to the dorsal Y group of the vestibular nuclei. *J Neurophysiol* 83, 2891-2904.
- Bok, J., Zha, X.M., Cho, Y.S., Green, S.H., 2003. An extranuclear locus of cAMP-dependent protein kinase action is necessary and sufficient for promotion of spiral ganglion neuronal survival by cAMP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 777-787.
- Brigelius-Flohe, R., Maiorino, M., 2013. Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta* 1830, 3289-3303.
- Brodal, A., 1984. The vestibular nuclei in the macaque monkey. *The Journal of comparative neurology* 227, 252-266.
- Brodal, A., Pompeiano, O., 1957. The vestibular nuclei in cat. *J Anat* 91, 438-454.
- Brosel, S., Laub, C., Averdam, A., Elstner, M. 2012. YSG-3: Molecular Aging of the Vestibular System (Advisory Board Meeting, IFB Ludwig-Maximilians-University Munich).
- Brunet, A., Datta, S.R., Greenberg, M.E., 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology* 11, 297-305.
- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., Auwerx, J., 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.
- Cardiff, R.D., Miller, C.H., Munn, R.J., 2014. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor protocols* 2014, 655-658.
- Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A.A., Li, W., Leoni, V., Schon, E.A., Dantzer, F., Auwerx, J., Viscomi, C., Zeviani, M., 2014.

- NAD(+)-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. *Cell Metab* 19, 1042-1049.
- Chen, H.C., Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Kanoh, Y., Standaert, M., Farese, R.V., Jr., Farese, R.V., 2002. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 277, 23554-23562.
- Cheng, A.G., Cunningham, L.L., Rubel, E.W., 2005. Mechanisms of hair cell death and protection. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 13, 343-348.
- Chung, S.S., Kim, M., Youn, B.S., Lee, N.S., Park, J.W., Lee, I.K., Lee, Y.S., Kim, J.B., Cho, Y.M., Lee, H.K., Park, K.S., 2009. Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol* 29, 20-30.
- Chung, W.H., Pak, K., Lin, B., Webster, N., Ryan, A.F., 2006. A PI3K pathway mediates hair cell survival and opposes gentamicin toxicity in neonatal rat organ of Corti. *J Assoc Res Otolaryngol* 7, 373-382.
- Coling, D., Chen, S., Chi, L.H., Jamesdaniel, S., Henderson, D., 2009. Age-related changes in antioxidant enzymes related to hydrogen peroxide metabolism in rat inner ear. *Neuroscience letters* 464, 22-25.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., Weindruch, R., 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325, 201-204.
- Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., Hardie, D.G., 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European journal of biochemistry / FEBS* 229, 558-565.
- Cullen, K.E., 2012. The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. *Trends in neurosciences* 35, 185-196.
- Cunningham, L.L., Matsui, J.I., Warchol, M.E., Rubel, E.W., 2004. Overexpression of Bcl-2 prevents neomycin-induced hair cell death and caspase-9 activation in the adult mouse utricle in vitro. *Journal of neurobiology* 60, 89-100.
- Dai, Y., Kiselak, T., Clark, J., Clore, E., Zheng, K., Cheng, A., Kujoth, G.C., Prolla, T.A., Maratos-Flier, E., Simon, D.K., 2013. Behavioral and metabolic characterization of heterozygous and homozygous POLG mutator mice. *Mitochondrion* 13, 282-291.
- De Cesare, D., Sassone-Corsi, P., 2000. Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 64, 343-369.

- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., Nunez, G., 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Dillon, L.M., Hida, A., Garcia, S., Prolla, T.A., Moraes, C.T., 2012. Long-term bezafibrate treatment improves skin and spleen phenotypes of the mtDNA mutator mouse. *PLoS One* 7, e44335.
- DiMauro, S., Schon, E.A., 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348, 2656-2668.
- Duke, D.C., Moran, L.B., Pearce, R.K., Graeber, M.B., 2007. The medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease: mRNA profiles associated with higher brain tissue vulnerability. *Neurogenetics* 8, 83-94.
- Edgar, D., Larsson, N.G., Trifunovic, A., 2010. Response: Point Mutations Are Causing Progeroid Phenotypes in the mtDNA Mutator Mouse. *Cell Metab* 11, 93.
- Edgar, D., Shabalina, I., Camara, Y., Wredenberg, A., Calvaruso, M.A., Nijtmans, L., Nedergaard, J., Cannon, B., Larsson, N.G., Trifunovic, A., 2009. Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab* 10, 131-138.
- Ekstrand, M.I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C.B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C.M., Larsson, N.G., 2004. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human molecular genetics* 13, 935-944.
- Engstrom, H., Ades, H.W., Engstrom, B., Gilchrist, D., Bourne, G., 1977. Structural changes in the vestibular epithelia in elderly monkeys and humans. *Advances in oto-rhino-laryngology* 22, 93-110.
- Falkenberg, M., Larsson, N.G., Gustafsson, C.M., 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76, 679-699.
- Fischel-Ghodsian, N., Bykhovskaya, Y., Taylor, K., Kahen, T., Cantor, R., Ehrenman, K., Smith, R., Keithley, E., 1997. Temporal bone analysis of patients with presbycusis reveals high frequency of mitochondrial mutations. *Hear Res* 110, 147-154.
- Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T., Solas, D., 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767-773.
- Fukuchi, M., Tabuchi, A., Tsuda, M., 2005. Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: cumulative mRNA expression of PACAP and BDNF genes controlled by calcium and cAMP signals in neurons. *Journal of pharmacological sciences* 98, 212-218.

- Goa, K.L., Barradell, L.B., Plosker, G.L., 1996. Bezafibrate. An update of its pharmacology and use in the management of dyslipidaemia. *Drugs* 52, 725-753.
- Golubitzky, A., Dan, P., Weissman, S., Link, G., Wikstrom, J.D., Saada, A., 2011. Screening for active small molecules in mitochondrial complex I deficient patient's fibroblasts, reveals AICAR as the most beneficial compound. *PLoS One* 6, e26883.
- Green, D.R., Kroemer, G., 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Grunewald, A., Lax, N.Z., Rocha, M.C., Reeve, A.K., Hepplewhite, P.D., Rygiel, K.A., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2014. Quantitative quadruple-label immunofluorescence of mitochondrial and cytoplasmic proteins in single neurons from human midbrain tissue. *Journal of neuroscience methods* 232, 143-149.
- Guo, X., Bai, X., Li, L., Li, J., Wang, H., 2018. Forskolin protects against cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting apoptosis and ROS production. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 99, 530-536.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. *Free radicals in biology and medicine.*, fourth Edition. Oxford University Press, Oxford; New York.
- Han, C., Someya, S., 2013. Mouse models of age-related mitochondrial neurosensory hearing loss. *Molecular and cellular neurosciences* 55, 95-100.
- Hardie, D.G., 2004. AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Medicine and science in sports and exercise* 36, 28-34.
- Hardie, D.G., 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 774-785.
- Hardie, D.G., Sakamoto, K., 2006. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology* 21, 48-60.
- Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* 20, 145-147.
- Hayashi, H., Kunisada, T., Takakura, N., Aoki, M., Mizuta, K., Ito, Y., 2008. Involvement of platelet-derived growth factor receptor-beta in maintenance of mesenchyme and sensory epithelium of the neonatal mouse inner ear. *Hear Res* 245, 73-81.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., Montminy, M., 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183.

- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* 11, 1026-1030.
- Hock, M.B., Kralli, A., 2009. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual review of physiology* 71, 177-203.
- Igarashi, M., Saito, R., Mizukoshi, K., Alford, B.R., 1993. Otoconia in young and elderly persons: a temporal bone study. *Acta oto-laryngologica. Supplementum* 504, 26-29.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., Spiegelman, B.M., 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12017-12022.
- Jin, M.H., Oh, D.Y., 2019. ATM in DNA repair in cancer. *Pharmacology & therapeutics* 203, 107391.
- Jin, S., Cordes, N., 2019. ATM controls DNA repair and mitochondria transfer between neighboring cells. *Cell communication and signaling : CCS* 17, 144.
- Johri, A., Calingasan, N.Y., Hennessey, T.M., Sharma, A., Yang, L., Wille, E., Chandra, A., Beal, M.F., 2012. Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 21, 1124-1137.
- Jung, J.Y., Kim, J.S., Chung, P.S., Woo, S.H., Rhee, C.K., 2009. Effect of vestibular rehabilitation on dizziness in the elderly. *Am J Otolaryngol* 30, 295-299.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D.G., 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.
- Kanungo, S., Morton, J., Neelakantan, M., Ching, K., Saeedian, J., Goldstein, A., 2018. Mitochondrial disorders. *Annals of translational medicine* 6, 475.
- Keithley, E.M., 2020. Pathology and mechanisms of cochlear aging. *J Neurosci Res* 98, 1674-1684.
- Keithley, E.M., Canto, C., Zheng, Q.Y., Wang, X., Fischel-Ghodsian, N., Johnson, K.R., 2005. Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss. *Hear Res* 209, 76-85.
- Kelly, D.P., Scarpulla, R.C., 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* 18, 357-368.

- Khaidakov, M., Heflich, R.H., Manjanatha, M.G., Myers, M.B., Aidoo, A., 2003. Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 526, 1-7.
- Kim, J., Yoon, M.Y., Choi, S.L., Kang, I., Kim, S.S., Kim, Y.S., Choi, Y.K., Ha, J., 2001. Effects of stimulation of AMP-activated protein kinase on insulin-like growth factor 1- and epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 276, 19102-19110.
- Kim, M.J., Haroon, S., Chen, G.D., Ding, D., Wanagat, J., Liu, L., Zhang, Y., White, K., Park, H.J., Han, C., Boyd, K., Caicedo, I., Evans, K., Linser, P.J., Tanokura, M., Prolla, T., Salvi, R., Vermulst, M., Someya, S., 2019. Increased burden of mitochondrial DNA deletions and point mutations in early-onset age-related hearing loss in mitochondrial mutator mice. *Exp Gerontol* 125, 110675.
- Kobilo, T., Guerrieri, D., Zhang, Y., Collica, S.C., Becker, K.G., van Praag, H., 2014. AMPK agonist AICAR improves cognition and motor coordination in young and aged mice. *Learning & memory* 21, 119-126.
- Koda, H., Kimura, Y., Ishige, I., Eishi, Y., Iino, Y., Kitamura, K., 2010. Quantitative cellular level analysis of mitochondrial DNA 3243A > G mutations in individual tissues from the archival temporal bones of a MELAS patient. *Acta oto-laryngologica* 130, 344-350.
- Kokotas, H., Petersen, M.B., Willems, P.J., 2007. Mitochondrial deafness. *Clinical genetics* 71, 379-391.
- Kolesar, J.E., Safdar, A., Abadi, A., MacNeil, L.G., Crane, J.D., Tarnopolsky, M.A., Kaufman, B.A., 2014. Defects in mitochondrial DNA replication and oxidative damage in muscle of mtDNA mutator mice. *Free radical biology & medicine* 75, 241-251.
- Kraytsberg, Y., Simon, D.K., Turnbull, D.M., Khrapko, K., 2009. Do mtDNA deletions drive premature aging in mtDNA mutator mice? *Aging cell* 8, 502-506.
- Kreuzer, K.A., Lass, U., Landt, O., Nitsche, A., Laser, J., Ellerbrok, H., Pauli, G., Huhn, D., Schmidt, C.A., 1999. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. *Clinical chemistry* 45, 297-300.
- Krishnan, K.J., Greaves, L.C., Reeve, A.K., Turnbull, D.M., 2007. Mitochondrial DNA mutations and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 227-240.
- Kroenke, K., Hoffman, R.M., Einstadter, D., 2000. How common are various causes of dizziness? A critical review. *Southern medical journal* 93, 160-167; quiz 168.

- Kronke, G., Bochkov, V.N., Huber, J., Gruber, F., Bluml, S., Furnkranz, A., Kadl, A., Binder, B.R., Leitinger, N., 2003. Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 278, 51006-51014.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., Morrow, J.D., Van Remmen, H., Sedivy, J.M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., Prolla, T.A., 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481-484.
- Kuschel, M., Müller, O., Buhlmann, C., Technologies, A., 2002. Lab-on-a-chip technology. *Innovations in Pharmaceutical Technology Summer issue*, p.38-45.
- Lambert, H.W., Weiss, E.R., Lauder, J.M., 2001. Activation of 5-HT receptors that stimulate the adenylyl cyclase pathway positively regulates IGF-I in cultured craniofacial mesenchymal cells. *Developmental neuroscience* 23, 70-77.
- Larsson, N.G., Clayton, D.A., 1995. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annual review of genetics* 29, 151-178.
- Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.C., Staels, B., 2006. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *The Journal of clinical investigation* 116, 571-580.
- Li, X., Eriksson, U., 2003. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine & growth factor reviews* 14, 91-98.
- Lin, F.R., Thorpe, R., Gordon-Salant, S., Ferrucci, L., 2011. Hearing loss prevalence and risk factors among older adults in the United States. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66, 582-590.
- Lin, H.W., Bhattacharyya, N., 2012. Balance disorders in the elderly: Epidemiology and functional impact. *Laryngoscope* 122, 1858-1861.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Lindsay, J.R., Hinojosa, R., 1976. Histopathologic features of the inner ear associated with Kearns-Sayre syndrome. *Arch Otolaryngol* 102, 747-752.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular cell* 6, 1389-1399.

- Lopez, I., Ishiyama, G., Tang, Y., Tokita, J., Baloh, R.W., Ishiyama, A., 2005. Regional estimates of hair cells and supporting cells in the human crista ampullaris. *J Neurosci Res* 82, 421-431.
- Loponen, H., Ylikoski, J., Albrecht, J.H., Pirvola, U., 2011. Restrictions in cell cycle progression of adult vestibular supporting cells in response to ectopic cyclin D1 expression. *PLoS One* 6, e27360.
- Marangos, P.J., Loftus, T., Wiesner, J., Lowe, T., Rossi, E., Browne, C.E., Gruber, H.E., 1990. Adenosinergic modulation of homocysteine-induced seizures in mice. *Epilepsia* 31, 239-246.
- Markaryan, A., Nelson, E.G., Hinojosa, R., 2008. Detection of mitochondrial DNA deletions in the cochlea and its structural elements from archival human temporal bone tissue. *Mutat Res* 640, 38-45.
- Markaryan, A., Nelson, E.G., Hinojosa, R., 2009. Quantification of the mitochondrial DNA common deletion in presbycusis. *Laryngoscope* 119, 1184-1189.
- Markaryan, A., Nelson, E.G., Hinojosa, R., 2010. Major arc mitochondrial DNA deletions in cytochrome c oxidase-deficient human cochlear spiral ganglion cells. *Acta oto-laryngologica* 130, 780-787.
- Matheson, A.J., Darlington, C.L., Smith, P.F., 1999. Dizziness in the elderly and age-related degeneration of the vestibular system. *New Zealand journal of psychology* 28, 10-16.
- McFadden, S.L., Ding, D., Burkard, R.F., Jiang, H., Reaume, A.G., Flood, D.G., Salvi, R.J., 1999. Cu/Zn SOD deficiency potentiates hearing loss and cochlear pathology in aged 129,CD-1 mice. *The Journal of comparative neurology* 413, 101-112.
- McKnight, G.S., Cummings, D.E., Amieux, P.S., Sikorski, M.A., Brandon, E.P., Planas, J.V., Motamed, K., Idzerda, R.L., 1998. Cyclic AMP, PKA, and the physiological regulation of adiposity. *Recent progress in hormone research* 53, 139-159; discussion 160-131.
- Merino, J.J., Roncero, C., Oset-Gasque, M.J., Naddaf, A., Gonzalez, M.P., 2014. Antioxidant and protective mechanisms against hypoxia and hypoglycaemia in cortical neurons in vitro. *International journal of molecular sciences* 15, 2475-2493.
- Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., Winder, W.W., 1997. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American journal of physiology* 273, E1107-1112.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J.E., Jr., 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15, 575-591.

- Mojsa, B., Mora, S., Bossowski, J.P., Lassot, I., Desagher, S., 2015. Control of neuronal apoptosis by reciprocal regulation of NFATc3 and Trim17. *Cell death and differentiation* 22, 274-286.
- Nakada, K., Sato, A., Sone, H., Kasahara, A., Ikeda, K., Kagawa, Y., Yonekawa, H., Hayashi, J., 2004. Accumulation of pathogenic DeltamtDNA induced deafness but not diabetic phenotypes in mito-mice. *Biochemical and biophysical research communications* 323, 175-184.
- Negishi-Oshino, R., Ohgami, N., He, T., Ohgami, K., Li, X., Kato, M., 2019. cVEMP correlated with imbalance in a mouse model of vestibular disorder. *Environmental health and preventive medicine* 24, 39.
- Nguyen, T., Di Giovanni, S., 2008. NFAT signaling in neural development and axon growth. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26, 141-145.
- Niu, X., Trifunovic, A., Larsson, N.G., Canlon, B., 2007. Somatic mtDNA mutations cause progressive hearing loss in the mouse. *Experimental cell research* 313, 3924-3934.
- Noe, N., Dillon, L., Lellek, V., Diaz, F., Hida, A., Moraes, C.T., Wenz, T., 2013. Bezafibrate improves mitochondrial function in the CNS of a mouse model of mitochondrial encephalopathy. *Mitochondrion* 13, 417-426.
- Ould Amer, Y., Hebert-Chatelain, E., 2018. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics* 1859, 868-877.
- Park, J.J., Tang, Y., Lopez, I., Ishiyama, A., 2001. Age-related change in the number of neurons in the human vestibular ganglion. *The Journal of comparative neurology* 431, 437-443.
- Perier, C., Bender, A., Garcia-Arumi, E., Melia, M.J., Bove, J., Laub, C., Klopstock, T., Elstner, M., Mounsey, R.B., Teismann, P., Prolla, T., Andreu, A.L., Vila, M., 2013. Accumulation of mitochondrial DNA deletions within dopaminergic neurons triggers neuroprotective mechanisms. *Brain : a journal of neurology* 136, 2369-2378.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., Spiegelman, B.M., 1999. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368-1371.
- Rauch, S.D., Velazquez-Villasenor, L., Dimitri, P.S., Merchant, S.N., 2001. Decreasing hair cell counts in aging humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 942, 220-227.
- Richter, E., 1980. Quantitative study of human Scarpa's ganglion and vestibular sensory epithelia. *Acta oto-laryngologica* 90, 199-208.

- Roberts, W.M., Howard, J., Hudspeth, A.J., 1988. Hair cells: transduction, tuning, and transmission in the inner ear. *Annual review of cell biology* 4, 63-92.
- Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C.N., Singh, R., 2010. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacological research* 61, 269-280.
- Rosenhall, U., 1973. Degenerative patterns in the aging human vestibular neuro-epithelia. *Acta oto-laryngologica* 76, 208-220.
- Rosenhall, U., Rubin, W., 1975. Degenerative changes in the human vestibular sensory epithelia. *Acta oto-laryngologica* 79, 67-80.
- Rothblum-Oviatt, C., Wright, J., Lefton-Greif, M.A., McGrath-Morrow, S.A., Crawford, T.O., Lederman, H.M., 2016. Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet journal of rare diseases* 11, 159.
- Scarpulla, R.C., 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews* 88, 611-638.
- Schon, E.A., DiMauro, S., Hirano, M., 2012. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature reviews. Genetics* 13, 878-890.
- Seidman, M.D., 2000. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* 110, 727-738.
- Shiloh, Y., Ziv, Y., 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 197-210.
- Shoubridge, E.A., 2001. Nuclear gene defects in respiratory chain disorders. *Seminars in neurology* 21, 261-267.
- Skladal, D., Halliday, J., Thorburn, D.R., 2003. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain : a journal of neurology* 126, 1905-1912.
- Someya, S., Xu, J., Kondo, K., Ding, D., Salvi, R.J., Yamasoba, T., Rabinovitch, P.S., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Prolla, T.A., 2009. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 19432-19437.
- Someya, S., Yamasoba, T., Kujoth, G.C., Pugh, T.D., Weindruch, R., Tanokura, M., Prolla, T.A., 2008. The role of mtDNA mutations in the pathogenesis of age-related hearing loss in mice carrying a mutator DNA polymerase gamma. *Neurobiol Aging* 29, 1080-1092.
- Someya, S., Yamasoba, T., Weindruch, R., Prolla, T.A., Tanokura, M., 2007. Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Neurobiol Aging* 28, 1613-1622.

- Staecker, H., Liu, W., Malgrange, B., Lefebvre, P.P., Van De Water, T.R., 2007. Vector-mediated delivery of bcl-2 prevents degeneration of auditory hair cells and neurons after injury. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 69, 43-50.
- Strupp, M., Brandt, T., 2008. Diagnosis and treatment of vertigo and dizziness. *Deutsches Arzteblatt international* 105, 173-180.
- Takahashi, K., Merchant, S.N., Miyazawa, T., Yamaguchi, T., McKenna, M.J., Kouda, H., Iino, Y., Someya, T., Tamagawa, Y., Takiyama, Y., Nakano, I., Saito, K., Boyer, P., Kitamura, K., 2003. Temporal bone histopathological and quantitative analysis of mitochondrial DNA in MELAS. *Laryngoscope* 113, 1362-1368.
- Tascioglu, A.B., 2005. Brief review of vestibular system anatomy and its higher order projections. *Neuroanatomy* 4, 24-27.
- Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature reviews. Genetics* 6, 389-402.
- Tenenbaum, A., Motro, M., Fisman, E.Z., 2005. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovascular diabetology* 4, 14.
- Thomson, D.M., Herway, S.T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J.D., Barrow, J.R., Winder, W.W., 2008. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol* (1985) 104, 429-438.
- Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A.T., Dufour, E., Khvorostov, I., Spelbrink, J.N., Wibom, R., Jacobs, H.T., Larsson, N.G., 2005. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17993-17998.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T., Larsson, N.G., 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- Valentin-Vega, Y.A., Maclean, K.H., Tait-Mulder, J., Milasta, S., Steeves, M., Dorsey, F.C., Cleveland, J.L., Green, D.R., Kastan, M.B., 2012. Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood* 119, 1490-1500.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular research* 79, 208-217.
- Vermulst, M., Bielas, J.H., Kujoth, G.C., Ladiges, W.C., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A., Loeb, L.A., 2007. Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nat Genet* 39, 540-543.

- Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G.C., Bielas, J.H., Rabinovitch, P.S., Prolla, T.A., Loeb, L.A., 2008. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet* 40, 392-394.
- Vermulst, M., Wanagat, J., Loeb, L.A., 2009. On mitochondria, mutations, and methodology. *Cell Metab* 10, 437.
- Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., Schon, E.A., Lamperti, C., Zeviani, M., 2011. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1alpha axis. *Cell Metab* 14, 80-90.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics* 39, 359-407.
- Wenz, T., Diaz, F., Spiegelman, B.M., Moraes, C.T., 2008. Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab* 8, 249-256.
- Werner, M., Van De Water, T.R., Andersson, T., Arnoldsson, G., Berggren, D., 2012. Morphological and morphometric characteristics of vestibular hair cells and support cells in long term cultures of rat utricle explants. *Hear Res* 283, 107-116.
- Wersall, J., 1956. Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampulares in the guinea pig; a light and electron microscopic investigation. *Acta oto-laryngologica. Supplementum* 126, 1-85.
- Winder, W.W., Holmes, B.F., Rubink, D.S., Jensen, E.B., Chen, M., Holloszy, J.O., 2000. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *Journal of applied physiology* 88, 2219-2226.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M., 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Yamasoba, T., Lin, F.R., Someya, S., Kashio, A., Sakamoto, T., Kondo, K., 2013. Current concepts in age-related hearing loss: Epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res* 303, 30-38.
- Yamasoba, T., Someya, S., Yamada, C., Weindruch, R., Prolla, T.A., Tanokura, M., 2007. Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss. *Hear Res* 226, 185-193.
- Yatsuga, S., Suomalainen, A., 2012. Effect of bezafibrate treatment on late-onset mitochondrial myopathy in mice. *Human molecular genetics* 21, 526-535.

- Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 47-59.
- Zha, X.M., Bishop, J.F., Hansen, M.R., Victoria, L., Abbas, P.J., Mouradian, M.M., Green, S.H., 2001. BDNF synthesis in spiral ganglion neurons is constitutive and CREB-dependent. *Hear Res* 156, 53-68.
- Zhang, X., Zhu, J., Yang, G.Y., Wang, Q.J., Qian, L., Chen, Y.M., Chen, F., Tao, Y., Hu, H.S., Wang, T., Luo, Z.G., 2007. Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nature cell biology* 9, 743-754.
- Zheng, J.L., Helbig, C., Gao, W.Q., 1997. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 216-226.

Anhang

Tabelle 1: Zusammenfassung der Signalweg-Analyse der mit AICAR behandelten Utrikel der Wildtyp-Mäuse.

Name	p-Wert	Gene
Krankheiten und Störungen		
Developmental Disorder	< 0,015	162
Skeletal and Muscular Disorders	< 0,015	242
Connective Tissue Disorders	< 0,015	125
Neurological Disease	< 0,015	196
Organismal Injury and Abnormalities	< 0,015	339
Molekulare und zelluläre Funktionen		
RNA Post-Transcriptional Modification	< 0,009	51
Cellular Growth and Proliferation	< 0,015	408
Molecular Transport	< 0,015	81
Protein Trafficking	< 0,001	47
Cell Morphology	< 0,015	274
Physiologische Funktion		
Connective Tissue Development and Function	< 0,015	131
Tissue Morphology	< 0,015	131
Cardiovascular System Development and Function	< 0,015	113
Organ Morphology	< 0,015	106
Organismal Development	< 0,015	235

Tabelle 2: Die ersten 50 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit AICAR.

	Ingenuity Signalwege	Gene	Herab-reguliert	Hoch-reguliert	p-Wert
1	Cardiac Hypertrophy Signaling	209	0 %	15 %	< 0,001
2	PDGF Signaling	77	0 %	21 %	< 0,001
3	Thrombin Signaling	183	0 %	15 %	< 0,001
4	Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	168	0 %	15 %	< 0,001
5	Ceramide Signaling	76	0 %	20 %	< 0,001
6	PPARα/RXRα Activation	156	0 %	15 %	< 0,001
7	Gα12/13 Signaling	113	0 %	17 %	< 0,001
8	AMPK Signaling	171	0 %	15 %	0,001
9	Protein Kinase A Signaling	349	0 %	12 %	0,001
10	G Beta Gamma Signaling	86	0 %	17 %	0,001
11	Tight Junction Signaling	154	0 %	14 %	0,001
12	Mitochondrial Dysfunction	135	0 %	15 %	0,001
13	Prostate Cancer Signaling	80	0 %	18 %	0,002
14	Cdc42 Signaling	109	0 %	16 %	0,002
15	Integrin Signaling	190	0 %	13 %	0,002
16	Rac Signaling	102	0 %	16 %	0,002
17	Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	160	0 %	14 %	0,002
18	GNRH Signaling	121	0 %	15 %	0,002
19	CDK5 Signaling	94	0 %	16 %	0,003
20	RhoA Signaling	113	0 %	15 %	0,003
21	Colorectal Cancer Metastasis Signaling	225	0 %	12 %	0,003
22	phagosome maturation	105	0 %	15 %	0,003
23	Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	154	0 %	14 %	0,003
24	Actin Cytoskeleton Signaling	198	0 %	13 %	0,004
25	ILK Signaling	167	0 %	13 %	0,004

Anhang

26	Lipid Antigen Presentation by CD1	16	0 %	31 %	0,004
27	IL-1 Signaling	89	0 %	16 %	0,004
28	Relaxin Signaling	128	0 %	14 %	0,004
29	CXCR4 Signaling	149	0 %	13 %	0,005
30	Synaptic Long Term Potentiation	110	0 %	15 %	0,005
31	Chemokine Signaling	64	0 %	17 %	0,005
32	OX40 Signaling Pathway	39	0 %	21 %	0,006
33	Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	74	0 %	16 %	0,006
34	Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	112	0 %	14 %	0,006
35	Glioblastoma Multiforme Signaling	142	0 %	13 %	0,006
36	PAK Signaling	84	0 %	15 %	0,006
37	Inhibition of Angiogenesis by TSP1	32	0 %	22 %	0,007
38	RhoGDI Signaling	164	0 %	13 %	0,007
39	Insulin Receptor Signaling	124	0 %	14 %	0,007
40	Apoptosis Signaling	85	0 %	15 %	0,007
41	Amyloid Processing	49	0 %	18 %	0,007
42	Gap Junction Signaling	145	0 %	13 %	0,008
43	P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	115	0 %	14 %	0,008
44	HIF1 α Signaling	97	0 %	14 %	0,009
45	NF- κ B Signaling	159	0 %	13 %	0,010
46	Signaling by Rho Family GTPases	224	0 %	12 %	0,010
47	RAR Activation	181	0 %	12 %	0,010
48	PI3K Signaling in B Lymphocytes	119	0 %	13 %	0,011
49	Pyrimidine Deoxyribonucleotides De Novo Biosynthesis I	20	0 %	25 %	0,012
50	LPS-stimulated MAPK Signaling	71	0 %	15 %	0,012
68	PPAR Signaling	86	0 %	14 %	0,019

Tabelle 3: Zusammenfassung der Signalweg-Analyse der mit Bezafibrat behandelten Utrikel der Wildtyp-Mäuse.

Name	p-Wert	Gene
Krankheiten und Störungen		
Connective Tissue Disorders	< 0,030	59
Developmental Disorder	< 0,030	93
Neurological Disease	< 0,030	83
Organismal Injury and Abnormalities	< 0,030	202
Skeletal and Muscular Disorders	< 0,030	44
Molekulare und zelluläre Funktionen		
Post-Translational Modification	< 0,030	31
Cell Cycle	< 0,030	46
Cell Death and Survival	< 0,030	145
Cell Morphology	< 0,030	58
RNA Post-Transcriptional Modification	< 0,029	23
Physiologische Funktion		
Connective Tissue Development and Function	< 0,030	52
Organ Morphology	< 0,030	19
Skeletal and Muscular System Development and Function	< 0,030	11
Tissue Morphology	< 0,030	45
Nervous System Development and Function	< 0,030	40

Tabelle 4: Die ersten 50 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ mit Bezafibrat.

	Ingenuity Signalwege	Gene	Herab-reguliert	Hoch-reguliert	p-Wert
1	Wnt/Ca ⁺ pathway	54	0 %	17 %	< 0,000
2	Lipid Antigen Presentation by CD1	16	0 %	25 %	0,001
3	Glutathione Redox Reactions I	15	0 %	20 %	0,010
4	Prostate Cancer Signaling	80	0 %	9 %	0,011
5	Glioblastoma Multiforme Signaling	142	0 %	7 %	0,011
6	PPAR Signaling	86	0 %	8 %	0,015
7	Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	33	0 %	12 %	0,017
8	Role of IL-17A in Psoriasis	7	0 %	29 %	0,017
9	Mitochondrial Dysfunction	135	0 %	7 %	0,022
10	Cardiac Hypertrophy Signaling	209	0 %	6 %	0,026
11	RhoGDI Signaling	164	0 %	6 %	0,028
12	Protein Ubiquitination Pathway	236	0 %	6 %	0,028
13	Dolichyl-diphosphooligosaccharide Biosynthesis	9	0 %	22 %	0,029
14	Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	39	0 %	10 %	0,030
15	Dendritic Cell Maturation	143	0 %	6 %	0,030
16	Melatonin Degradation III	1	0 %	100 %	0,030
17	Adenine and Adenosine Salvage VI	1	0 %	100 %	0,030
18	Phosphatidylethanolamine Biosynthesis III	1	0 %	100 %	0,030
19	Glutamate Biosynthesis II	1	0 %	100 %	0,030
20	Glutamate Degradation X	1	0 %	100 %	0,030
21	ILK Signaling	167	0 %	6 %	0,031
22	Sphingosine-1-phosphate Signaling	102	0 %	7 %	0,035
23	AMPK Signaling	171	0 %	6 %	0,035
24	iNOS Signaling	42	0 %	10 %	0,038
25	phagosome maturation	105	0 %	7 %	0,041
26	Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	63	0 %	8 %	0,042
27	Antigen Presentation Pathway	26	0 %	12 %	0,043
28	TREM1 Signaling	64	0 %	8 %	0,045
29	Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	154	0 %	6 %	0,045
30	Cleavage and Polyadenylation of Pre-mRNA	12	0 %	17 %	0,049
31	BER pathway	12	0 %	17 %	0,049
32	Synaptic Long Term Potentiation	110	0 %	6 %	0,050
33	Thrombin Signaling	183	0 %	5 %	0,052
34	Wnt/ β -catenin Signaling	160	0 %	6 %	0,055
35	Phospholipase C Signaling	210	0 %	5 %	0,055
36	Lipoate Biosynthesis and Incorporation II	2	0 %	50 %	0,060
37	P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	115	0 %	6 %	0,060
38	Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	92	0 %	7 %	0,060
39	Molecular Mechanisms of Cancer	351	0 %	5 %	0,069
40	PI3K Signaling in B Lymphocytes	119	0 %	6 %	0,071
41	Estrogen Receptor Signaling	120	0 %	6 %	0,072
42	GNRH Signaling	121	0 %	6 %	0,076
43	Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	276	0 %	5 %	0,078
44	CXCR4 Signaling	149	0 %	5 %	0,083
45	Systemic Lupus Erythematosus Signaling	149	0 %	5 %	0,083
46	PDGF Signaling	77	0 %	6 %	0,085
47	Glucocorticoid Receptor Signaling	253	0 %	5 %	0,085
48	Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	176	0 %	5 %	0,087
49	Methylglyoxal Degradation I	3	0 %	33 %	0,089
50	Glutathione Redox Reactions II	3	0 %	33 %	0,089

Anhang

Tabelle 5: Zusammenfassung der Signalweg-Analyse der mit AICAR behandelten Utrikel der „mtDNA-mutator“-Mäuse.

Name	p-Wert	Gene
Krankheiten und Störungen		
Cancer	< 0,028	1003
Organismal Injury and Abnormalities	< 0,028	1006
Reproductive System Disease	< 0,021	463
Metabolic Disease	< 0,027	176
Infectious Diseases	< 0,024	24
Molekulare und zelluläre Funktionen		
Cellular Function and Maintenance	< 0,027	109
Cell Morphology	< 0,027	171
Cell Signaling	< 0,021	57
Cellular Assembly and Organization	< 0,027	74
Molecular Transport	< 0,028	106
Physiologische Funktion		
Embryonic Development	< 0,028	168
Tissue Morphology	< 0,027	86
Skeletal and Muscular System Development and Function	< 0,027	70
Organ Morphology	< 0,027	91
Reproductive System Development and Function	< 0,022	18

Tabelle 6: Die ersten 50 mit „Ingenuity Pathway Analysis“ ermittelten veränderten Signalwege durch die Behandlung der „Utrikel-Explants“ der „mtDNA-mutator“-Mäuse mit AICAR.

	Ingenuity Signalwege	Gene	Herab-reguliert	Hoch-reguliert	p-Wert
1	Prostate Cancer Signaling	80	9 %	10 %	< 0,000
2	Calcium Signaling	155	5 %	10 %	0,001
3	Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	92	8 %	9 %	0,002
4	CREB Signaling in Neurons	160	6 %	8 %	0,002
5	Prolactin Signaling	72	8 %	8 %	0,004
6	Melanocyte Development and Pigmentation Signaling	83	8 %	7 %	0,005
7	T Cell Receptor Signaling	93	5 %	10 %	0,005
8	ErbB4 Signaling	57	7 %	11 %	0,006
9	Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	85	8 %	7 %	0,006
10	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	33	3 %	18 %	0,007
11	GABA Receptor Signaling	60	12 %	5 %	0,009
12	Endometrial Cancer Signaling	52	10 %	8 %	0,010
13	S-adenosyl-L-methionine Biosynthesis	3	33 %	33 %	0,014
14	Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	94	3 %	11 %	0,014
15	Non-Small Cell Lung Cancer Signaling	65	8 %	8 %	0,015
16	Neurotrophin/TRK Signaling	65	8 %	8 %	0,015
17	Renin-Angiotensin Signaling	106	6 %	8 %	0,017
18	Synaptic Long Term Potentiation	110	5 %	8 %	0,022
19	Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	51	4 %	12 %	0,025
20	TGF- β Signaling	81	9 %	5 %	0,026
21	PPAR α /RXR α Activation	156	8 %	4 %	0,026
22	Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	168	5 %	6 %	0,028
23	MSP-RON Signaling Pathway	43	2 %	14 %	0,030
24	RAR Activation	181	4 %	7 %	0,030
25	α -Adrenergic Signaling	83	4 %	10 %	0,031
26	Neuregulin Signaling	84	7 %	6 %	0,033
27	VEGF Family Ligand-Receptor Interactions	74	7 %	7 %	0,034

Anhang

28	FGF Signaling	85	6 %	7 %	0,035
29	Angiopoietin Signaling	65	8 %	6 %	0,037
30	CCR3 Signaling in Eosinophils	108	4 %	8 %	0,040
31	Superpathway of Melatonin Degradation	46	4 %	11 %	0,041
32	G-Protein Coupled Receptor Signaling	246	4 %	7 %	0,041
33	EGF Signaling	56	5 %	9 %	0,041
34	Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	154	5 %	6 %	0,044
35	GDNF Family Ligand-Receptor Interactions	67	6 %	7 %	0,045
36	Ephrin A Signaling	47	2 %	13 %	0,045
37	Nicotine Degradation II	47	4 %	11 %	0,045
38	Cholesterol Biosynthesis I	12	8 %	17 %	0,048
39	Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	12	8 %	17 %	0,048
40	Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	12	8 %	17 %	0,048
41	Gap Junction Signaling	145	6 %	6 %	0,049
42	Ephrin Receptor Signaling	168	4 %	7 %	0,049
43	Myc Mediated Apoptosis Signaling	58	7 %	7 %	0,049
44	Role of RIG1-like Receptors in Antiviral Innate Immunity	29	10 %	7 %	0,050
45	Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	276	4 %	6 %	0,051
46	Glucocorticoid Receptor Signaling	253	4 %	6 %	0,054
47	Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	49	6 %	8 %	0,054
48	Natural Killer Cell Signaling	91	4 %	8 %	0,054
49	Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling	91	4 %	8 %	0,054
50	p53 Signaling	91	3 %	9 %	0,054
159	AMPK Signaling	171	3 %	6 %	0,224
193	PPAR Signaling	86	6 %	3 %	0,258

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Matthias Elstner für die Überlassung des Themas und Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit. Seine fachliche Unterstützung und Supervision haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Elstner, insbesondere Frau Dr. phil. Sonja Brosel, danke ich für die Hilfe bei der Umsetzung dieser Arbeit, sowie zahlreiche wertvolle praktische und fachliche Hinweise.

Ich danke zudem Prof. Dr. med. Thomas Klopstock und Dr. rer. nat. Lore Becker der German Mouse Clinic für die erfolgreiche Kooperation zur Zucht und Phänotypisierung der Mäuse. Ebenso danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Meitinger des Instituts für Humangenetik am Helmholtz Zentrum München für die Kooperation zur technischen Durchführung des Microarrays.

Ich danke Frau Prof. Dr. Marianne Dieterich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit an der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mitsamt Bereitstellung der nötigen Räumlichkeiten und Technik.

Dem Programm zur Förderung von Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Ermöglichung und finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

Schließlich gilt mein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich mit viel Verständnis während des Studiums und dieser Arbeit begleitet haben. Die kontinuierliche Unterstützung und Motivation waren eine unverzichtbare Hilfe.

Eidesstaatliche Versicherung

Ich, Amelie Christina Zimmermann,

erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Molekulare Mechanismen der altersassoziierten vestibulären Dysfunktion“

selbstständig 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.

Ulm, den 16.12.2021

Amelie Zimmermann