

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

**Charakterisierung altersspezifischer Effekte von
Polymorphismen der mitochondrialen DNA
auf das murine Gehirn**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Gesine Reichart

Rostock, 2020

Gutachter:

Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

Universitätsmedizin Rostock, Oscar Langendorff Institut für Physiologie

Prof. Dr. med. Björn Spittau

Universität Bielefeld, Medizinische Fakultät, AG3 Anatomie und Zellbiologie

Prof. Dr. med. Manfred Kunz

Universitätsklinikum Leipzig, Klinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Theorien des Alterns	3
1.2	Mitochondrien – die Kraftwerke der Zelle und noch viel mehr	4
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies – Freund oder Feind?	8
1.4	Veränderungen in der mitochondrialen DNA – Ursache oder Wirkung des Alterungsprozesses?	13
1.5	Altern des Gehirns	16
1.6	Zielstellung	18
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Versuchstiere	20
2.1.1	Haltungsbedingungen	20
2.1.2	Altersgruppen und Geschlechterzusammensetzung	20
2.1.3	Verwendete Mausstämme	22
2.2	Präparation von akuten Hirnschnitten	27
2.3	Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid	28
2.4	Quantifizierung von astrozyten- und neuronenspezifischen Markerproteinen	29
2.5	Versuche zum räumlichen Lernvermögen im Morris Water Maze (MWM)	31
2.6	Erfassung der mittleren Lebensdauer	33
2.7	Statistische Analysen	34
2.8	Chemikalien und Geräte	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid	38
3.1.1	Altersverlauf der Kontrollstämme	38
3.1.2	Altersverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette	40
3.1.3	Altersverlauf der UCP2-Knockout-Mutante	43
3.1.4	Altersverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA	44
3.2	Quantifizierung astrozyten- und neuronenspezifischer Markerproteine	46
3.2.1	Altersverlauf der Kontrollstämme	46
3.2.2	Altersverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette	47
3.2.3	Altersverlauf der UCP2-Knockout-Mutante	49
3.2.4	Altersverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA	50
3.3	Räumliches Lernvermögen im Morris Water Maze	51

3.3.1	Lernverlauf der Kontrollstämme	51
3.3.2	Lernverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette	52
3.3.3	Lernverlauf der UCP2-Knockout-Mutante	58
3.3.4	Lernverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA	59
3.4	Erfassung der mittleren Lebensdauer	61
3.4.1	Lebensdauer der Kontrollstämme	62
3.4.2	Lebensdauer der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette	63
3.4.3	Lebensdauer der UCP2-Knockout-Mutante	65
3.4.4	Lebensdauer der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA	66
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
4	Diskussion	71
4.1	Der Einfluss von einzelnen Punktmutationen in Genen der mitochondrialen Atmungskette	72
4.2	Der Einfluss von Punktmutationen in Genen der mitochondrialen tRNA	80
4.3	Der Einfluss einer Kombination von Punktmutationen in Genen der mitochondrialen Atmungskette und der tRNA	83
4.4	UCP2 Knockout als Positivkontrolle für mitochondriale Dysfunktion	87
4.5	Abschließende Betrachtungen	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	I
7	Anhang	XXII
7.1	Abkürzungsverzeichnis	XXII
7.2	Abbildungsverzeichnis	XXIV
7.3	Tabellenverzeichnis	XXV
7.4	Danksagung	XXVI
7.5	Selbständigkeitserklärung	XXVII

1 Einleitung

„Es ist wirklich verwunderlich, dass – nachdem das Wunderwerk der Embryogenese vollbracht ist – ein komplexes Metazoon an der viel simpler erscheinenden Aufgabe scheitert, einfach das zu erhalten, was schon geschaffen ist.“

George C. Williams, 1957

Der Traum vom ewig jungen Leben und das Bestreben, dem natürlichen Prozess des Alterns entgegenzuwirken, ist so alt wie die Menschheit selbst. Biologisches Altern wird definitionsgemäß als stetig fortschreitende generelle Abnahme der Funktionstüchtigkeit eines Organismus (Seneszenz) definiert, die zu zunehmender Anfälligkeit gegenüber Umwelteinflüssen, abnehmender Fertilität, einem erhöhten Risiko für Krankheiten und letztlich zum Tod führt (Kirkwood, 2005). Dem entsprechend verlieren Lebewesen während des Alterns zunehmend an körperlicher Integrität, was die Frage aufwirft, warum sich in der Evolution bisher kein passender Gegenmechanismus etabliert hat. Bei den meisten Metazoa erreichen die Individuen einer natürlichen Population nur sehr selten ein Alter in dem Seneszenz eine Rolle spielt. Meist sterben sie deutlich früher auf Grund extrinsischer Ursachen (Finch, 2009). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die natürliche Selektion während der Evolution praktisch keinen Einfluss auf lange Lebenszeitspannen ausübt.

Menschliche Populationen unterscheiden sich in diesem Punkt immer stärker in Bezug auf ihre Altersstruktur. Durch technischen und gesellschaftlichen Fortschritt kam es vor allem in den industriell entwickelten Staaten zu einem deutlichen Anstieg der mittleren Lebensdauer. Neben körperlicher Entlastung durch die Entwicklung neuer Technologien, einem verbesserten Nahrungsangebot und politischen Veränderungen wird insbesondere die rasche Entwicklung medizinischen Wissens dafür verantwortlich gemacht, dass die Mortalität im Säuglings- und Erwachsenenalter stark gesunken ist (Vaupel, 2010). Infolge dessen stieg und steigt die Zahl älterer Menschen in der Gesellschaft an. Lag die Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland um 1900 noch bei etwa 40 Jahren für Männer und 45 Jahren für Frauen (Abbildung E1), so war sie 2015 schon fast doppelt so hoch mit 78 Jahren für Männer und 83 Jahren für Frauen und wird auch weiterhin steigend prognostiziert (Statistisches Bundesamt, 2019). Dieser Anstieg der mittleren Lebenserwartung geht gleichzeitig mit dem vermehrten Auftreten

altersbedingter Probleme und Erkrankungen einher, wodurch ein steigender Forschungsbedarf zur Untersuchung der Prozesse besteht, die dem Altern und der Seneszenz zu Grunde liegen.

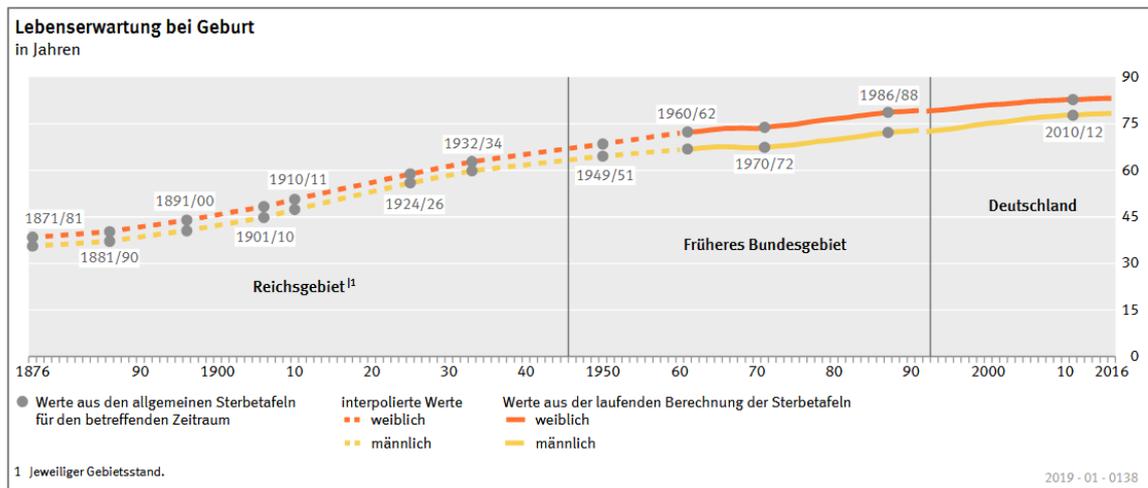


Abbildung E1: Mittlere Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland. (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Statistisches Jahrbuch 2019, S.37)

Um 1900 lag die Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland für Männer bei etwa 40 Jahren, für Frauen bei 45 Jahren. Bis 2016 hatte sie sich nahezu verdoppelt und wird auch weiterhin steigend prognostiziert.

1.1 Theorien des Alterns

Die Frage nach der (molekular)biologischen Ursache für das Altern hat im Laufe der Zeit verschiedene Theorien hervorgebracht. Zu den populärsten gehören die sogenannten Schadenstheorien, welche Altern als einen Vorgang beschreiben, der durch die Summe von während des Lebens auftretenden zellulären Schäden hervorgerufen wird. Eine der ältesten Theorien aus diesem Bereich ist die *Rate of Living Theory*, welche bereits 1928 von Raymond Pearl aufgestellt wurde. Dieser schloss, aufbauend auf Vorarbeiten von Rubner (Rubner, 1908), dass die Lebenserwartung durch Zellbestandteile limitiert sei, die mit erhöhtem Stoffwechsel schneller abgebaut beziehungsweise beschädigt würden und somit die Lebenserwartung eines Organismus umgekehrt proportional zu seiner Stoffwechselrate sei (Pearl, 1928).

1959 entwickelte Szilard die *Somatic Mutation Theory*, in der Veränderungen in den Chromosomen der Kern-DNA, sogenannte *aging hits*, als Motor des Alterungsprozesses beschrieben wurden (Szilard, 1959). Infolge dessen rückte die DNA des Zellkerns in den Fokus der Alternsforschung und in Fortführung dieser Theorie konnte zum Beispiel Promislow 1994 einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Langlebigkeit und Reparaturmechanismen zum intakten Erhalt der DNA im Zellkern belegen (Promislow, 1994). Ferner wurde Mitogenen (Blagosklonny, 2003) und Tumorsuppressor-Proteinen (Beausejour *et al.*, 2003) eine Beteiligung an der Induktion zellulärer Alterung zugeschrieben.

1961 stellten Hayflick und Moorhead an Zellkulturen von humanen Fibroblasten fest, dass sich normale menschliche Zellen nicht beliebig oft teilen können und somit nicht unsterblich sind (Hayflick und Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Teilten sich Fibroblasten von Feten in Kultur noch bis zu 80 mal, so konnten die gleichen Zellen aus einem älteren Erwachsenen dies nur noch 10 bis 20 mal. Diese Beobachtung wurde als *zelluläre Seneszenz* beschrieben und führte in ihrer Weiterentwicklung von Calvin Harley (Harley, 1991; Harley *et al.*, 1992) zur sogenannten *Telomere Loss Theory*. Telomere sind die aus repetitiven DNA-Abschnitten bestehenden Endstücke von Chromosomen. Sie werden bei jeder Zellteilung verkürzt und ihre Länge ist somit in etwa parallel zum Zellalter. Ab einer bestimmten Telomerlänge verlangsamt sich die Zellteilungsrate, die Zelle wird seneszent und teilt sich anschließend nicht mehr. Als Beweis für die Telomer-Hypothese des Alterns wird zum Beispiel das Klon-Schaf Dolly angesehen: Es wurde aus einer Körperzelle eines fünf Jahre alten Schafes geklont, bei

dem die Telomere bereits verkürzt waren. Dolly verstarb deutlich vor dem Erreichen der mittleren Lebenserwartung eines Schafes und zeigte früh einsetzende Alterssymptome (Vogel, 2000). Allerdings sind in postmitotischen Geweben, wie Gehirn und Herzmuskel, die Telomerlängen über den gesamten Zeitraum des Alterns weitestgehend konstant (Takubo *et al.*, 2002), weshalb hier ein telomer-unabhängiger Alterungsmechanismus eine Rolle spielen muss.

Besonders bekannt wurde die 1956 von Harman entwickelte *Free Radical Theory of Aging* (Harmann, 1956), in der das Altern und damit assoziierte degenerative Erkrankungen der Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS – *reactive oxygen species*) zugeschrieben werden. Harman postulierte, dass Sauerstoffradikale mit ihrer Freisetzung wichtige Moleküle der Zelle, wie DNA, RNA und eine Vielzahl von Proteinen und Lipiden, schädigen. Dies führe zu einer stetig wachsenden Ansammlung von geschädigten Zellkomponenten, was wiederum den komplexen Alterungsprozess bewirkt. Nach anfänglicher Ablehnung wurde diese Theorie sehr populär und der theoretische Ansatz stetig weiterentwickelt. Da die mitochondriale Atmungskette für den größten Teil der intrazellulären ROS-Entstehung verantwortlich ist, rückten Mitochondrien immer mehr in den Fokus der Alternsforschung. Dies führte letztendlich zu einer Weiterentwicklung der Theorie der freien Radikale hin zur *Mitochondrial Theory of Aging* (Harmann, 1972), welche durch oxidative Schäden hervorgerufene Veränderungen in Mitochondrien als den primären Grund für den Alterungsprozess ansieht.

1.2 Mitochondrien – die Kraftwerke der Zelle und noch viel mehr

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgebene Organellen, die in nahezu allen Zellen von eukaryotischen Organismen zu finden sind. Sie nehmen aus mehreren Gründen einen besonderen Stellenwert innerhalb eukaryotischer Zellen ein: Wahrscheinlich endosymbiontisch in den Metabolismus eukaryotischer Vorläuferzellen integriert (Margulis, 1970; Gray, 2012), sind sie die einzigen Organellen tierischer Zellen, die neben dem Zellkern ein eigenes Genom besitzen. Die mitochondriale DNA (mtDNA) besteht aus einem zirkulären doppelsträngigen Molekül, welches bei Säugetieren etwa 16000 Basenpaare (bp), beim Menschen konkret 16569 bp, groß ist.

Sie liegt innerhalb der Mitochondrienmatrix in Nukleoidkomplexen vor (Richter *et al.*, 1988) und wird, bis auf wenige Ausnahmen (Luo *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2020) rein maternal vererbt. Die mtDNA kodiert dreizehn Proteinuntereinheiten, welche alle Teil der mitochondrialen Atmungskette sind, und 24 RNA-Komponenten (22 tRNAs und 2 rRNAs). Die meisten mitochondrialen Proteine sind allerdings im Zellkern kodiert und müssen in die Mitochondrien importiert werden (Lagouge und Larsson, 2013). Je nach Zelltyp variiert die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle zwischen 10^3 und 10^4 bei normalen Körperzellen, beziehungsweise 10^5 bei Oozyten.

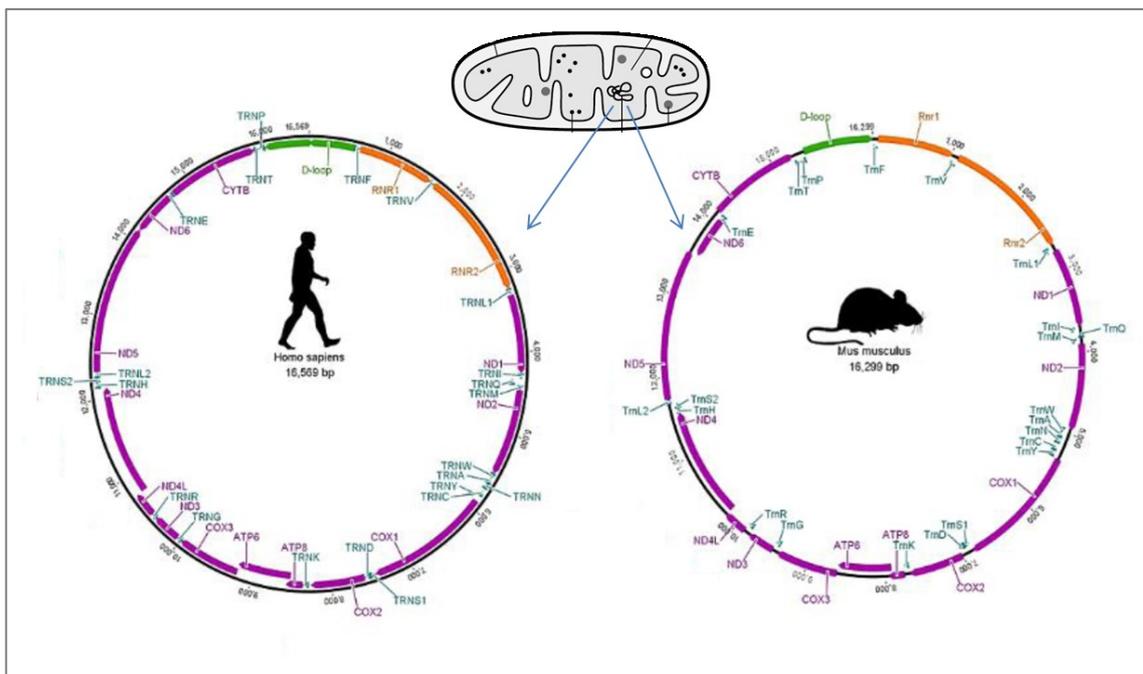


Abbildung E2: Die mitochondriale DNA besteht aus einem circulären doppelsträngigen Molekül und ist bei Säugetieren etwa 16 kbp groß. (verändert nach Kazachkova *et al.*, 2013)

Die linke Teilabbildung zeigt eine Genkarte des humanen mitochondrialen Genoms, welches 16569 bp groß ist. Im Vergleich dazu zeigt die rechte Teilabbildung eine Karte des murinen Mitochondriengenoms, welches 16299 bp groß ist. Die 13 Proteinuntereinheiten der mitochondrialen Atmungskette, welche die mtDNA kodiert, sind violett gekennzeichnet.

Mitochondrien sind keine starren Strukturen, vielmehr bilden sie ein Netzwerk, welches ständig dynamischen Prozessen unterliegt (Baltrusch, 2016). Dabei verschmelzen einzelne Mitochondrien miteinander und trennen sich auch wieder ab (*Fusion* und *Fission*) (Bereiter-Hahn und Voth, 1994; Nunnari *et al.*, 1997; Archer, 2013). Diese Prozesse werden zu einem großen Teil durch den Energiemetabolismus der Zelle gesteuert (Yu *et al.*, 2008; Rambold *et al.*, 2011; Mishra und Chan, 2016).

Mitochondrien spielen bei diversen zellulären Prozessen eine zentrale Rolle, zum Beispiel bei der β -Oxidation von Fettsäuren, der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern, bei der Steuerung der Apoptose, als Calciumspeicher und Ort vieler wichtiger Stoffwechselwege (Kauppila *et al.*, 2017). Dabei ist die ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung von besonderer Bedeutung, da ATP (Adenosintriphosphat) der universelle Energieträger und Regulator energieliefernder Prozesse in Zellen ist. Beim Abbau von Nährstoffen werden Elektronen auf Carriermoleküle wie NAD^+ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und FAD^+ (Flavin-Adenin-Dinukleotid) übertragen, welche anschließend in Form von NADH und FADH_2 Elektronen an die Elektronentransportkette weiterleiten. Die Enzymkomplexe der Elektronentransportkette befinden sich an der inneren Mitochondrienmembran (Abbildung E3). Zur Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung sind in Säugetierzellen fünf Enzymkomplexe nötig. Die Komplexe I bis IV bilden dabei die Elektronentransportkette, Komplex V ist eine ATP-Synthase.

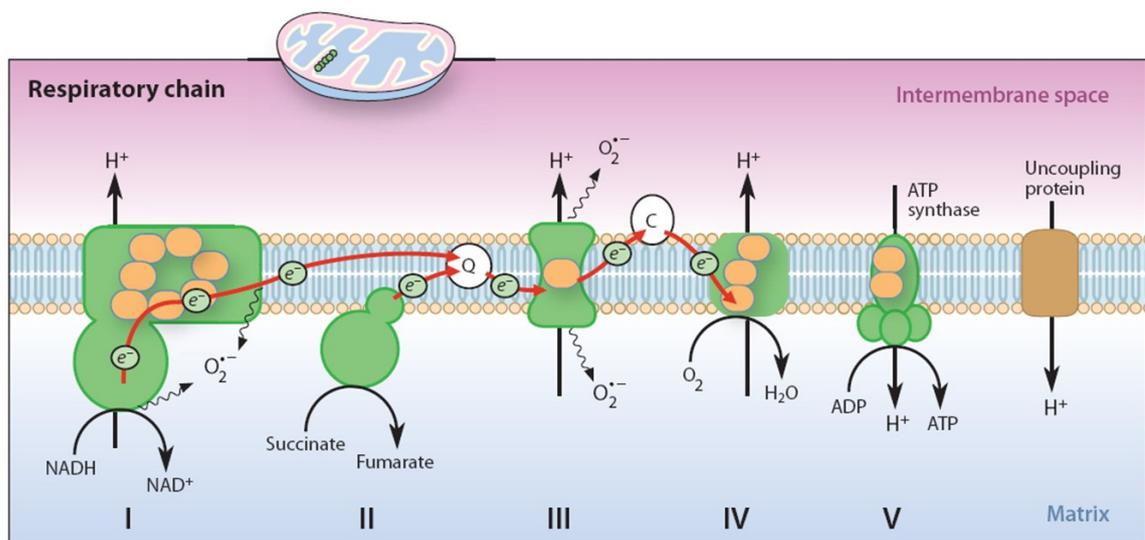


Abbildung E3: Die mitochondriale Atmungskette. (Larsson, 2010)

An der Elektronentransportkette (rote Pfeillinie) und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien sind fünf Enzymkomplexe beteiligt. Die mitochondriale DNA kodiert Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V (orange Punkte). Die Komplexe I, III und IV pumpen Protonen (H^+) über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum. Der dadurch aufgebaute Gradient wird von Komplex V zur Synthese von ATP aus ADP genutzt. Die enge Kopplung von Elektronentransport und ATP-Synthese kann durch entkoppelnde Proteine (Uncoupling proteins) aufgehoben werden. Elektronen (e^-) können überdies, vornehmlich bei Komplex I und III, die Elektronentransportkette verlassen. Dabei entsteht das Sauerstoffradikal Superoxid-Anion (O_2^-).

Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) erhalten, vor allem aus dem Zitratzyklus, Elektronen (e^-) und übertragen diese auf Coenzym Q. Dieses leitet die Elektronen an Komplex III (Cytochrom-c-Oxidoreduktase) weiter. Das Elektronentransportprotein Cytochrom-c überträgt die Elektronen auf Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase), welcher im finalen Schritt der Elektronentransportkette Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) reduziert. Der Elektronentransport ist damit verbunden, dass die Komplexe I, III und IV Protonen (H^+) über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum pumpen. Dabei entsteht ein elektrochemischer Transmembrangradient, welcher für die Ausbildung eines Mitochondrienmembranpotenzials von 150 bis 180 mV verantwortlich ist (Trifujnovic und Larsson, 2008). Der Protonengradient treibt die ATP-Synthese durch Komplex V an, ATP-Produktion und Elektronentransport sind normalerweise eng miteinander gekoppelt (Hatefi, 1985; Saraste, 1999).

Protonen können außerdem aus dem Intermembranraum über Entkopplungsproteine (UCPs - *uncoupling proteins*) transloziert werden, was Elektronentransport und ATP-Synthese von einander entkoppelt (Trifujnovic und Larsson, 2008). UCPs sind mitochondriale Carrierproteine, welche in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind. Obwohl die Entkopplung durch eine Verringerung des Protonengradienten die ATP-Produktion akut vermindert, führt die chronische Aktivität von entkoppelnden Proteinen dazu, dass die Proliferation von Mitochondrien angeregt wird und darüber die ATP-Produktion pro Zelle sogar gesteigert werden kann (Andrews *et al.*, 2005). Zudem senkt das Entkoppeln das mitochondriale Membranpotenzial. Ein depolarisiertes Membranpotenzial wiederum verringert die Aufnahme von Calciumionen in die Mitochondrien und kann darüber unter Stressbedingungen eine Calciumüberladung und resultierende Apoptose verhindern (Stout *et al.*, 1998). Überdies stellt die Funktion der UCPs eine Art Ventilmechanismus dar, durch den ein reverser Elektronentransport (Scialo *et al.*, 2017) und eine erhöhte Produktion von Sauerstoffradikalen verhindert wird (NegreSalvayre *et al.*, 1997; Arsenijevic *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2005; Mailloux *et al.*, 2011).

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies – Freund oder Feind?

Im Verlauf der Elektronentransportkette werden nicht alle Elektronen bis zum Ende übertragen und es kommt zu „Elektronenlecks“, vornehmlich an Komplex I und Komplex III (Abbildungen E3 und E4).

Komplex I katalysiert mit seinen verschiedenen redoxaktiven Gruppen den Elektronentransfer von NADH auf Coenzym Q (Morgan-Hughes *et al.*, 1988; Ragan, 1990). Dabei bindet initial FMN (Flavin-Mononukleotid) in der Mitochondrienmatrix gebildetes NADH (Fearnley und Walker, 1992) und übernimmt dessen Elektronenpaar. Entweichen hierbei Elektronen, wird dadurch gelöster Sauerstoff in der Mitochondrienmatrix zum Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) reduziert.

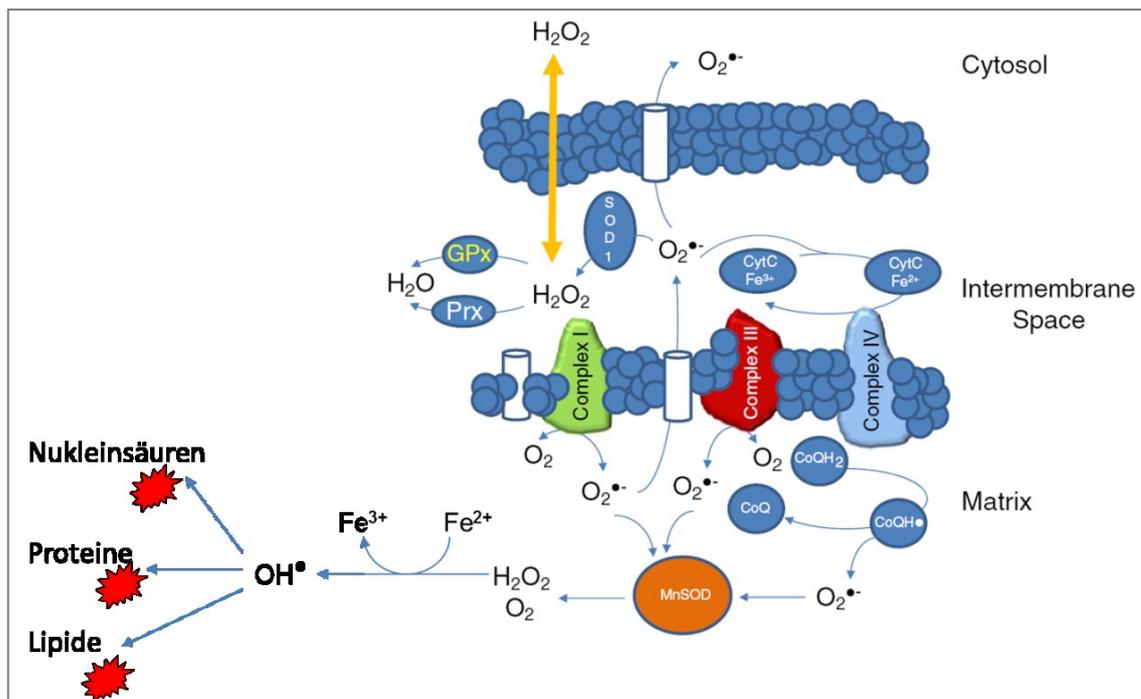


Abbildung E4: Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und deren Umwandlung in Mitochondrien. (verändert nach Zou *et al.*, 2017)

Die mitochondriale Atmungskette (dargestellt sind Komplex I, III und IV) ist ein Hauptentstehungsort für ROS in Mitochondrien. Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) entsteht während des Elektronentransports, wenn Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden. Es kann durch Superoxid-Dismutasen (SOD1 und MnSOD) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt und weiterführend enzymkatalysiert (GPx Glutathion-Peroxidase; Prx Peroxiredoxin) zu Wasser (H_2O) abgebaut werden. Unter Beteiligung von Übergangsmetallen (Fe^{2+} zweiwertiges Eisen; Fe^{3+} dreiwertiges Eisen) kann aus Wasserstoffperoxid das hoch reaktive Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) gebildet werden, welches mit Nucleinsäuren, Proteinen oder Lipiden reagieren und diese damit verändern und letztendlich schädigen (rote Sterne) kann.

Komplex III transferiert Elektronen von Coenzym Q weiter auf Cytochrom-c. An seinen zwei Bindestellen können Elektronen entweichen und sowohl auf Seiten der Matrix, als auch zwischen den Mitochondrienmembranen auf Sauerstoff übertragen werden und ebenfalls Superoxid-Anionen bilden (Adam-Vizi, 2005; Murphy, 2009; Jastroch *et al.*, 2010).

Superoxidanionen sind einfach negativ geladene Sauerstoffionen, die aufgrund ihres ungepaarten Valenzelektrons sehr reaktiv sind. Sie sind die primäre Form der in Mitochondrien entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies, von der ausgehend weitere ROS-Formen gebildet werden (Turrens, 2003). Zusammen mit Wasserstoffionen wird aus Superoxidanionen spontan oder katalysiert durch Superoxid-Dismutasen (SOD) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet. Dieses wiederum kann durch verschiedene Enzyme, wie zum Beispiel die Glutathion-Peroxidase (GPx) oder die Katalase, weiter zu Wasser abgebaut werden. Wird Wasserstoffperoxid, vornehmlich durch zweiwertige Eisenionen (Fe^{2+}), nur partiell reduziert, entsteht das hochgradig reaktive Hydroxylradikal ($OH\cdot$). Dieses ist eines der stärksten natürlichen Oxidantien; es ist in der Lage, mit Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden zu reagieren.

Aufgrund ihrer Reaktivität spielen Sauerstoffradikale eine ambivalente Rolle in Zellen: Einerseits sind sie sowohl intra- als auch interzellulär wichtige Effektor- oder Signalmoleküle, andererseits können sie die Zellbestandteile durch Oxidation schädigen.

Am längsten bekannt ist sicherlich die positive Funktion von ROS bei der Immunabwehr. Aktivierte Neutrophile und Makrophagen produzieren beim sogenannten *Oxidative Burst* Sauerstoffradikale, um gegen aufgenommene Antigene vorzugehen (Keisari *et al.*, 1983; Morel *et al.*, 1991). Darüberhinaus können ROS die Adhäsion von Leukocyten an Endothelzellen vermitteln (Schaller *et al.*, 1992) und T-Zell Funktionen, wie die Produktion von Interleukin-2, induzieren (Los *et al.* 1995). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass auch nicht-phagozytierende Zellen mit einem kleinen, dem *Oxidative Burst* ähnlichen, Anstieg der ROS-Konzentration auf Stimuli wie Cytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone reagieren (Thannickel *et al.*, 2000). Dies führte zu der Erkenntnis, dass ROS eine entscheidende physiologische Rolle als sekundäre Signalmoleküle spielen. Besonders bedeutend erscheint diese Rolle in MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) Signalwegen, über die Zellprozesse wie Wachstum und Differenzierung, aber auch Apoptose oder Nekrose gesteuert werden. Dabei sind ROS Teil der Informationsübertragung von Signalen außerhalb der Zelle,

welche zum Beispiel über Tyrosinkinase-Rezeptoren (Sundaresam *et al.*, 1996; Neufeld *et al.*, 1999) eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen. Vor allem Wasserstoffperoxid scheint für die Signalweitergabe von Bedeutung, da es im Vergleich zu den anderen ROS-Molekülen relativ langlebig weil weniger reaktiv ist und Membranen passieren kann (Antunes *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2007; Winterbourn 2008). Besonders gut charakterisiert ist die Wirkung von Wasserstoffperoxid auf Tyrosin-Phosphatasen. Diese werden reversibel durch H₂O₂ inaktiviert indem es die Cysteinreste der aktiven Zentren oxidiert (Salmeen *et al.*, 2005).

Ebenso sind ROS in der Lage, über verschiedene Signalwege eine Calciumfreisetzung in der Zelle zu bewirken. Darüber werden nachfolgend Kinasen aktiviert, wie zum Beispiel die Proteinkinase C (PKC), welche wichtige Teilprozesse der Zellproliferation steuert (Dempsey *et al.*, 2000).

Außerdem sind mitochondriale ROS an vielen Homöostase-Signalwegen beteiligt, wie bei Anpassungsmechanismen unter Hypoxiebedingungen (Schieber *et al.*, 2014), der Regulation des intrazellulären pH-Werts (Johnson *et al.*, 2012) oder bei Wundheilungsprozessen (Xu *et al.*, 2014).

Besonders interessant im Zusammenhang mit physiologischen Funktionen von mitochondrialen ROS ist das Konzept der *Mitohormesis*. Gemäß dem bereits von Paracelsus formulierten Hormesis-Begriff, dass geringe Dosen schädlicher Substanzen eine positive Wirkung auf den Organismus haben können, führt milder oxidativer Stress zu einer Bandbreite an langanhaltenden metabolischen und biochemischen Veränderungen, welche protektiv wirken (Ristow *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2014). In Bezug auf den Gesamtorganismus scheinen diese Veränderungen die Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten zu vermindern und gleichzeitig die Lebensdauer zu erhöhen. Dabei nehmen Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Aktivierung dieser Veränderungen ein und ROS werden als Signalmoleküle diskutiert, über die die Mitochondrien mit dem Zellkern kommunizieren können (Abbildung E5).

Bedeutend für die Entwicklung des *Mitohormesis*-Konzeptes waren vor allem Erkenntnisse aus Experimenten mit dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*, bei dem experimentelle Glucose-Restriktion zu einer verlängerten Lebenszeit führt (Schulz *et al.*, 2007). Dabei wurde eine Art Kaskade beobachtet, bei der kompensatorisch zur verringerten Glucoseverfügbarkeit zunächst die mitochondriale Atmungsaktivität und der Fettabbau durch β -Oxidation in den Fadenwürmern erhöht war. Als Resultat der erhöhten Atmungsaktivität wurden erhöhte mitochondriale ROS-

Spiegel gemessen, die in der Folge zu gesteigerten Gehalten an ROS-abbauenden Enzymen führten, welche die ROS-Niveaus wieder normalisierten. Wurde der gleiche Versuchsansatz mit zusätzlicher Gabe von Antioxidantien durchgeführt, kam es zu keiner Erhöhung der ROS-Spiegel und gleichzeitig zu keiner Erhöhung der Lebensdauer, sodass davon auszugehen war, dass mitochondriale ROS hormetische Veränderungen eingeleitet haben, die zu erhöhter Resistenz gegenüber Stressoren und allgemeiner Langlebigkeit führten. Dieses Ergebnis wurde in Nachfolgestudien auch für andere Organismen bestätigt (Yang *et al.*, 2010; Owusu-Ansah *et al.*, 2013). Auf den Menschen übertragen lässt sich mit dem Konzept *Mitohormesis* beispielsweise die lange bekannte positive Wirkung körperlicher Aktivität erklären. Diese würde im Sinne eines milden Stressors mitohormetische Prozesse initiieren, die unter anderem eine Erhöhung körpereigener antioxidativer Proteine zur Folge haben. Die beobachteten gesundheitsfördernden Effekte bleiben bei Einnahme von Antioxidantien folglich aus, sodass die Schlüsselrolle von ROS bei der *Mitohormesis* auch für den Menschen als sehr wahrscheinlich angenommen wird (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Ristow *et al.*, 2009).

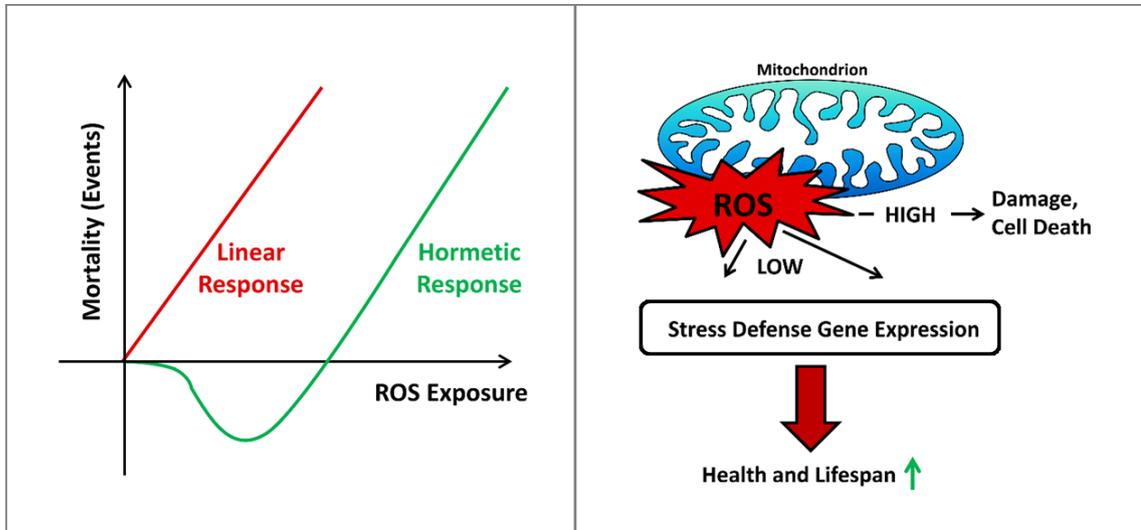


Abbildung E5: Die Rolle von ROS im Konzept der Mitohormesis. (verändert nach Ristow *et al.*, 2014)

Linke Teilabbildung: Während die *Free Radical Theory of Aging* eine lineare dosisabhängige Beziehung zwischen ROS-Mengen und Mortalität postuliert, zeichnet das Konzept der *Mitohormesis* eine nicht-lineare Beziehung zwischen diesen beiden Größen, wobei geringe Mengen ROS die Mortalitätswahrscheinlichkeit verringern, hohe Mengen ROS dagegen die Mortalität erhöhen.

Rechte Teilabbildung: Hohe ROS-Level schädigen intrazellulär Moleküle, was zum Tod der betroffenen Zellen und letztendlich des Gesamtorganismus führt. Niedrige ROS-Gehalte dagegen stimulieren die Transkription von Genen der Stressabwehr, was zu erhöhter Gesundheit und Lebenserwartung führt.

Im Zusammenhang altersassoziierter Veränderungen stehen allerdings überwiegend die negativen Eigenschaften von ROS im Fokus:

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren aus Phospholipiden sind sehr anfällig für Oxidationen durch Sauerstoffradikale, vor allem durch das Hydroxylradikal (Halliwell *et al.*, 1993; Siems *et al.*, 1995). Dabei entstehen Peroxylradikale, die in weiteren Reaktionsschritten zu Aldehyden, vornehmlich Malondialdehyd (MDA), umgewandelt werden. Aldehyde wirken in Zellen sowohl mutagen als auch cancerogen. Darüberhinaus kommt es durch die Oxidation der Phospholipide zu Veränderungen der Membranstabilität bis hin zur Zerstörung von Phospholipidmembranen (Molavi *et al.*, 2004). Die Lipidperoxidation wird als ein Hauptmechanismus der pathologischen Wirkung von ROS im Gehirn angesehen (Shirley *et al.*, 2014).

Proteine sind vor allem an Methionin- und Cystein-reichen Seitenketten anfällig für Oxidation, bei der zum Beispiel Disulphidbrücken ausgebildet werden (Stadtman *et al.*, 2004). Resultierende Veränderungen in der Proteinstruktur können zu Entfaltungen, Fragmentierung, Dysfunktion und zum vorzeitigen Abbau durch Peptidasen führen (Stadtman, 1992).

Vor allem das Hydroxylradikal reagiert mit allen Komponenten der DNA und schädigt sowohl die Purin- und Pyrimidinbasen, als auch das Zucker-Phosphat-Skelett (Halliwell *et al.*, 1999). Eine typische Veränderung der DNA, die durch das Hydroxylradikal hervorgerufen wird, ist die oxidierte Form des Desoxyguanosins, das 8-oxo-dG. 8-oxo-dG gilt als mutagen, weil es bei anschließender DNA Replikation zu einer Basenpaarung mit Desoxyadenosin anstatt des üblichen Desoxycytidins kommen kann, woraus eine G-zu-T Transversion resultiert (Briebe *et al.*, 2004).

1.4 Veränderungen in der mitochondrialen DNA – Ursache oder Wirkung des Alterungsprozesses?

Die mitochondriale DNA scheint in besonderer Weise anfällig für Veränderungen während des Alterns zu sein. Verschiedene Studien zeigen altersassoziierte Modifikationen sowohl der Kopienzahl (Kazachkova *et al.*, 2013) als auch eine Akkumulation von mtDNA Mutationen (Bua *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2013; Greaves *et al.*, 2014). Es konnten sowohl Punktmutationen als auch Deletionen in der mtDNA nachgewiesen werden. Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussionen ist letztlich die Frage, ob diese Mutationen der Grund für, oder nur ein Korrelat des Alterns von Mitochondrien sind (Kauppila *et al.*, 2017). Es spricht allerdings viel dafür, dass sie in großem Maße zur Ausprägung von Altersphänotypen beitragen: Ein Beispiel, welches die Bedeutung von mtDNA Mutationen in Bezug auf das Altern belegt, ist das sogenannte *mtDNA mutator* Mausmodell. Die Tiere dieses Modells haben eine veränderte mtDNA Polymerase (POL γ), welche ihre Korrekturfunktion verloren hat. Infolge dessen kommt es zur Akkumulation großer Mengen mtDNA Mutationen und die Mäuse zeigen typische Anzeichen vorzeitigen Alterns mit verkürzter Lebenszeit, verringerter Fertilität, Anämie, Osteoporose und Haarausfall (Trifunovic *et al.*, 2004; Kujoth *et al.*, 2005). Ein weiteres Beispiel, das die Bedeutung von mtDNA Mutationen für den Alterungsverlauf zeigt, sind die vorzeitigen Alterungssymptome einiger HIV-Patienten (Desquilbet *et al.*, 2007; Guaraldi *et al.*, 2009). Diese werden darauf zurückgeführt, dass bestimmte anti-retrovirale Medikamente nachgewiesenermaßen auch die Funktion der mitochondrialen DNA Polymerase POL γ stören (Sohl *et al.*, 2015). Entsprechend findet sich bei diesen Patienten eine Vielzahl an Mutationen in der mtDNA und resultierende Funktionsstörungen der mitochondrialen Atmungskette (Payne *et al.*, 2011).

Dadurch, dass die mitochondriale DNA unabhängig vom Zellzyklus repliziert wird (Bogenhagen *et al.*, 1977), können Mutationen sowohl in allen mtDNA Kopien einer Zelle (Homoplasmie) als auch in nur einigen Kopien (Heteroplasmie) auftreten. Solche heteroplasmischen mtDNA Mutationen sind in nahezu allen Lebewesen nachweisbar und unterliegen, solange sie keine Regionen zur Regulation der mtDNA Replikation betreffen, keiner negativen Selektion (Wanrooij *et al.*, 2012). Dies begünstigt eine klonale Expansion von mtDNA Mutationen (Elson *et al.*, 2001; Greaves *et al.*, 2012; Kauppila *et al.*, 2017).

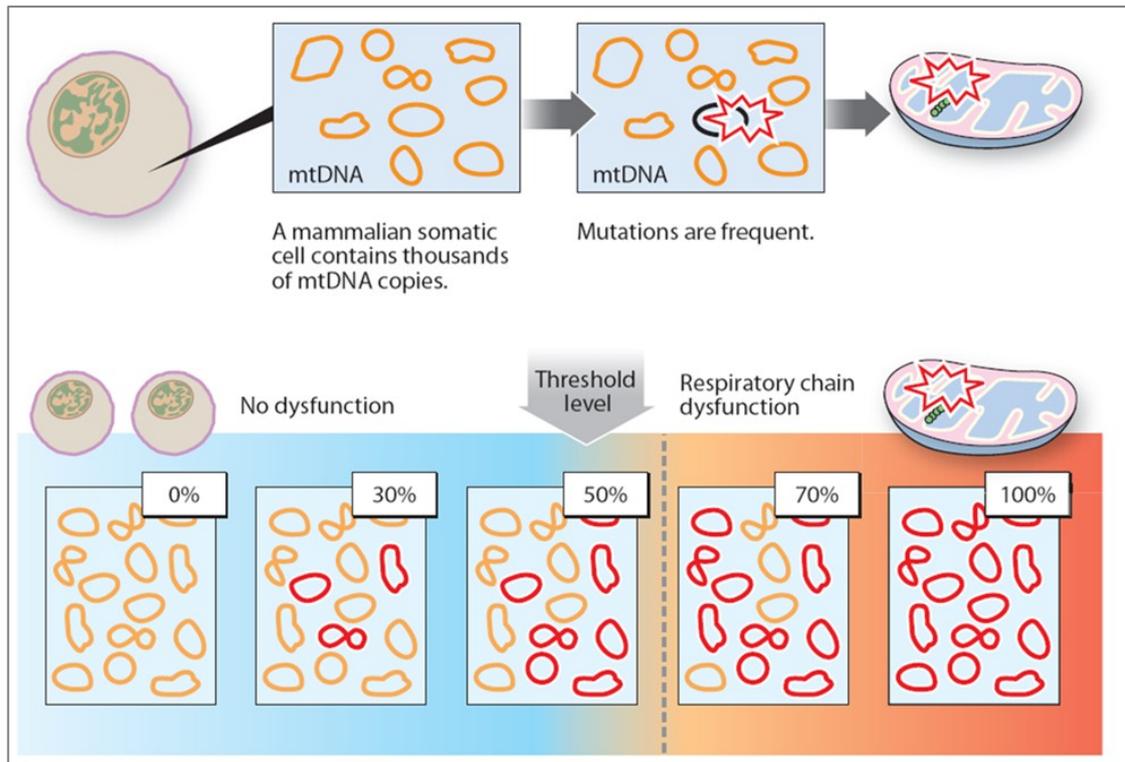


Abbildung E6: Klonale Expansion von mutierten mtDNA Molekülen führt erst nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes zu mitochondrialer Dysfunktion. (verändert nach Larsson, 2010)

Mutationen in der mtDNA sind relativ häufig. Allerdings hat ein einzelnes mutiertes mtDNA Molekül keine Bedeutung bei der großen Anzahl an mtDNA Kopien in einer Zelle. Die Replikation der mtDNA geschieht zellzyklusunabhängig und nicht für alle Kopien einer Zelle in gleicher Weise, wodurch es zu einer klonalen Expansion von mutierten mtDNA-Kopien kommen kann. Heteroplasmische mtDNA Mutationen führen erst nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes zur Dysfunktion des von der Mutation betroffenen Genprodukts.

Durch die zellzyklusunabhängige Replikation kann der Anteil mutierter mtDNA Kopien in der Zelle anwachsen. Gewebe, die überwiegend aus dauerhaft postmitotischen Zellen bestehen, sind für diese Art der klonalen Akkumulation von Mutationen besonders anfällig (Cortopassi *et al.*, 1992).

Übersteigt der Anteil mutierter mtDNA einen bestimmten Schwellenwert, zum Beispiel circa 60 % bei Genen für Atmungskettenkomponenten, resultiert daraus eine mitochondriale Dysfunktion der betroffenen Zellen (Larsson *et al.*, 1992; Rossignol *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2015) (Abbildung E6).

Die Ursache für die mit dem Alter zunehmende Zahl an mtDNA Punktmutationen wird gegenwärtig debattiert, wobei zwei verschiedene Theorien miteinander konkurrieren:

Die erste dieser Theorien entspricht der *Mitochondrial theory of aging* und besagt, dass die Mutationen ein Resultat von unreparierten oxidativen Schäden sind, welche sich während des Lebens in einer Art *circulus vitiosus* anhäufen.

Dagegen sieht die zweite Theorie die Quelle der Mutationen in Fehlern bei der mtDNA Replikation begründet. Für die erste Theorie spricht die Tatsache, dass alternde Gewebe für gewöhnlich immer oxidative Schäden (Bokov *et al.*, 2004) an Proteinen (Stadtman, 2006), Lipiden (Roberts *et al.*, 2001) und Nukleinsäuren aufweisen (Mecocci *et al.*, 1993; Hamilton *et al.*, 2001). Andererseits gibt es auch Studien, die einen Zusammenhang zwischen oxidativen Schäden und Altern in Frage stellen (Barja *et al.*, 2000). Als ein Beispiel dafür gelten innerhalb der Ordnung der Nagetiere die sogenannten Nacktmulle (*Heterocephalus glaber*). Verglichen mit Mäusen kommt es bei diesen Tieren zu einer massiven Häufung oxidativer Zellschäden im Laufe ihres Lebens. Trotzdem leben Nacktmulle bis zu fünfzehnfach länger als Mäuse (Lewis *et al.* 2013). Überdies zeigen sowohl Mausmodelle mit Knockouts in wichtigen antioxidativen Enzymen (Gpx1^{-/-}; Sod2^{+/-}) als auch solche, die antioxidative Enzyme vermehrt exprimieren (SOD1 und SOD2), trotz Veränderungen im Gehalt an oxidativen Schäden keine signifikanten Unterschiede in ihrer Lebenszeitspanne (Pérez *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2016). Bei Versuchen zur Reduktion von Sauerstoffradikalen durch die Einnahme von Antioxidantien ergaben sich sogar zum Teil schädigende Effekte dieser Wirkstoffgruppe (Bjelakovic *et al.*, 2008), was tatsächlich die zwiespältige Rolle von ROS in Zellen betont.

Eindeutig schädigend werden ROS-Moleküle immer dann, wenn ihr Gehalt die Kapazität der ROS-abbauenden Enzyme deutlich übersteigt. Eine typischerweise durch ROS entstehende Veränderung der DNA ist die oxidierte Form des Desoxyguanosins, das 8-oxo-dG, aus der eine G-zu-T Transversion resultieren kann (Briebe *et al.*, 2004). Tatsächlich sind solche G-zu-T Transversionen in der mitochondrialen DNA vergleichsweise selten zu finden, da sie sowohl durch Mechanismen der POL γ (Graziewicz *et al.*, 2007) als auch durch Basen-Exzisions-Reparaturmechanismen (Kazak *et al.*, 2012) behoben werden. Vergleichende Analysen von Sequenzierungsdaten menschlicher mtDNA aus Hirngewebe zeigten zwar eine eindeutige Zunahme an mtDNA Mutationen mit dem Alter, allerdings handelt es sich dabei vor allem um Transitionen (Kennedy *et al.*, 2013), welche durch spontane Desaminierung oder Replikationsfehler entstehen (Lindahl *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 2006). Ähnliche Mutationsmuster wurden in der mtDNA alter Mäuse gefunden (Ameur *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2015), sodass es zunehmend als unwahrscheinlich angesehen wird, dass eine Anreicherung oxidativer Schäden hauptverantwortlich für mtDNA Mutationen und damit verbundene Alterung ist.

Zudem unterstützen computergenerierte Modelle die These, dass nur mtDNA Mutationen, die frühzeitig im Leben auftreten, genug Zeit haben, durch klonale Expansion einen derart hohen Gehalt an mutierter DNA zu erzeugen, dass die Schwelle zur mitochondrialen Dysfunktion überschritten wird (Elson *et al.*, 2001).

1.5 Altern des Gehirns

Wie alle Organe des Körpers zeigt auch das Gehirn eine altersbedingte Minderung seiner Funktionsfähigkeit. Allerdings scheinen einzelne Bereiche davon in unterschiedlichem Maße betroffen zu sein (Hedden *et al.*, 2004). Verhaltensbiologische Studien finden übereinstimmend sowohl Bereiche, die während des normalen Alterns (ohne klinisch relevante Phänotypen, wie zum Beispiel *Morbus Alzheimer*) relativ stabil bleiben, als auch solche, deren Funktionalität mit fortschreitendem Alter abnimmt: Die Verarbeitungsgeschwindigkeit, der räumlich-visuelle Teil des Arbeitsgedächtnisses und das episodische Gedächtnis zeigen nach Abschluss der Gehirnentwicklung eine lebenslange Funktionsabnahme (Park *et al.* 1996; Park *et al.*, 2002). Der artikulatorisch-phonologische Teil des Arbeitsgedächtnisses, das semantische und das prozedurale Gedächtnis bleiben über den Großteil des Erwachsenenlebens konstant und nehmen erst zum Ende des Lebens hin ab (Gregoire *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2002). Das autobiografische Gedächtnis und die emotionale Verarbeitung scheinen während des gesamten Lebens unverändert zu funktionieren (Fromholt *et al.*, 2003).

Daraus wird deutlich, das Altern trotz globaler Effekte kognitive Funktionen in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Die Suche nach neurodegenerativen Prozessen als Ursache abnehmender Funktionalität fokussiert sich im Wesentlichen auf zwei Hauptbereiche: den Neocortex als der multisensorische und motorische Teil der Großhirnrinde und die Hippocampale Formation als zentrale Struktur zur Gedächtniskonsolidierung. In verschiedenen Studien konnte über bildgebende Verfahren festgestellt werden, das die *Substantia grisea* in gealterten Gehirnen ein deutlich geringeres Volumen aufweist (Haug *et al.*, 1991; Resnick *et al.*, 2003). Dieser Volumenverlust scheint allerdings nicht, wie früher angenommen, durch das Absterben von Zellen, sondern vielmehr durch eine verminderte Anzahl an synaptischen Kontakten zu entstehen (Terry *et al.*, 2000; Yanker *et al.*, 2008) (Abbildung E7).

Der Präfrontale Cortex (PFC) ist davon in besonderer Weise betroffen (Resnick *et al.*, 2003; Raz *et al.*, 2003 und 2004; Park *et al.*, 2009). Der Hippocampus zeigt eher geringfügige Volumenveränderungen beim normalen Altern. Während das Volumen des lateralen Präfrontalen Cortexes bei 60-Jährigen im Durchschnitt um 20 % kleiner ist als das 20-Jähriger, verringert sich das Hippocampusvolumen in der selben Zeit nur um 2 % je Lebensdekade; es liegt bei 60 Jährigen folglich etwa 8 % unter dem Volumen 20 Jähriger (Raz *et al.*, 2004 und 2004b).

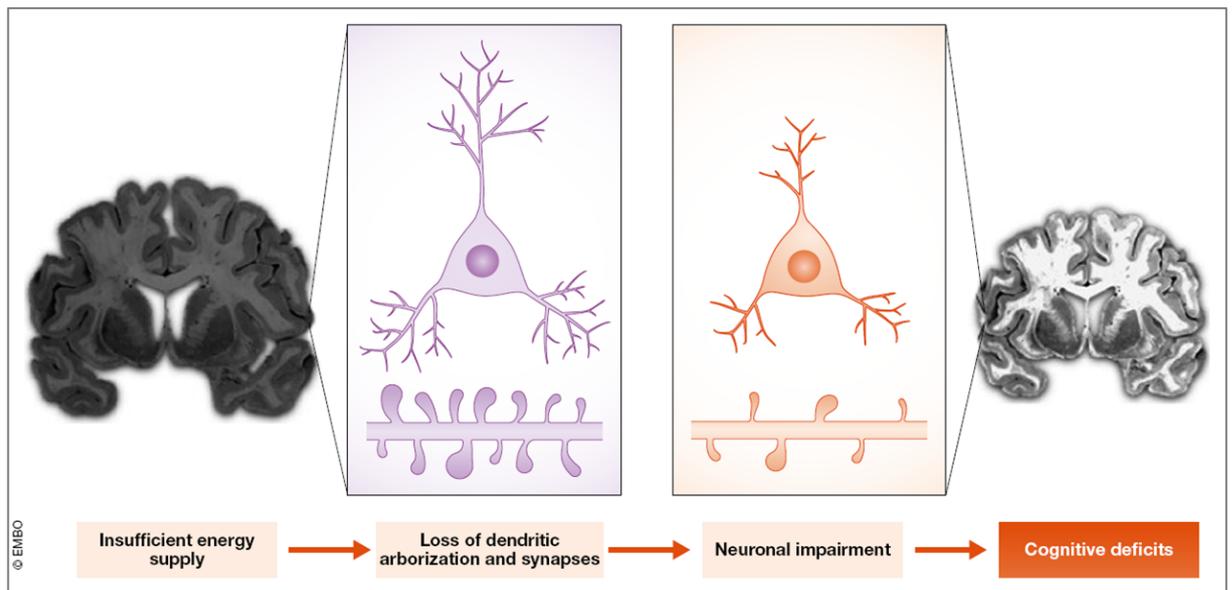


Abbildung E7: Altersbedingte kognitive Funktionsbeeinträchtigungen als Ergebnis neuroanatomischer Veränderungen ausgelöst durch einen verminderten Energiemetabolismus. (Camandola *et al.*, 2017) Im Vergleich mit Neuronen im jungen Gehirn (links), zeigen Neurone in gealterten Gehirnen eine deutliche Reduktion der Synapsendichte und Arborisierung. Altersassoziierte Änderungen im Energiestoffwechsel führen zu einer verminderten ATP-Synthese. Dadurch wird die Homöostase der synaptischen Bereiche gestört und die resultierenden strukturellen Veränderungen führen letztendlich zu kognitiven Beeinträchtigungen.

Auch für die *Substantia alba* wurde eine altersassoziierte Abnahme ihrer Dichte mit erhöhtem Auftreten von geschädigten Stellen (WML – *White Matter Lesions*) beschrieben (Guttmann *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001), ebenfalls vorrangig im Bereich des Präfrontalen Cortexes (O’Sullivan *et al.*, 2001). Funktionelle Studien mit bildgebenden Verfahren belegen eine sukzessive Abnahme des Glucose-Metabolismus‘ und anschließende mitochondriale Funktionseinschränkung im alternden Gehirn (De Leon *et al.*, 1983; Small *et al.*, 2000; Mosconi *et al.*, 2008). Da Synapsen Zellbereiche mit hohem Energieverbrauch sind, trifft ein verminderter Energiemetabolismus sie besonders stark (Attwel *et al.*, 2001; Alle *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2013; Rangaraju *et al.*, 2014).

Untersuchungen an Mäusen konnten belegen, dass es altersassoziiert zu einer Reduktion des ATP-Gehaltes in Axonen kommt. Diese korreliert mit ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien (Stahon *et al.*, 2016), welche durch eine Verschiebung des *Fusion-Fission*-Gleichgewichtes des mitochondrialen Netzwerkes in Richtung *Fusion* ausgelöst wird. Zudem zeigten Genexpressionsanalysen speziesübergreifend eine altersassoziierte Verminderung der Expression von Genen des mitochondrialen Energiemetabolismus (Zahn *et al.*, 2007). Somit gilt eine Schlüsselrolle mitochondrialer Veränderungen für den Alterungsprozess kognitiver Funktionen mehr als wahrscheinlich (Bishop *et al.*, 2010).

1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, verschiedene Mausmodelle mit Punktmutationen im mitochondrialen Genom in ihrem Altersverlauf zu charakterisieren. Dabei sollte der Einfluss dieser lebenslang vorhandenen Mutationen sowohl global auf die Lebensdauer, als auch im Speziellen auf das murine Gehirn untersucht werden. Da mitochondriale Sauerstoffradikale in mehreren Altershypothesen eine zentrale Bedeutung einnehmen, galt es, diese zu analysieren. Aktuelle Diskussionen gehen vor allem der Frage nach, wie mitochondriale ROS mit Mutationen in der mtDNA zusammenhängen. Sind sie Ursache oder Folgeerscheinung von mtDNA-Mutationen? Daher war von besonderem Interesse, ob die Mausmodelle grundsätzlich veränderte Gehalte an mitochondrialen ROS aufweisen, oder ob sich im Verlauf des Alterns Unterschiede zwischen den Stämmen einstellen? Da Altern einen der Hauptrisikofaktoren für viele neurodegenerative Erkrankungen darstellt (Spittau, 2017), galt es weiterhin, mögliche Veränderungen in der Zellzusammensetzung im Gehirn der Mausmodelle zu untersuchen. Dabei sollte konkret das Mengenverhältnis von Neuronen zu Astrocyten quantifiziert werden. Um einen funktionellen Bezug zwischen möglichen auf Zellebene beobachteten Veränderungen und *in vivo* Prozessen feststellen zu können, sollte überdies das Lernvermögen der Versuchstiere analysiert und dessen Veränderungen mit dem Alter charakterisiert werden.

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Führen einzelne Punktmutationen in der mitochondrialen DNA bei den zu untersuchenden Mausmodellen zu veränderten Gehalten an mitochondrialen ROS?
2. Potenziert sich die Wirkung der jeweiligen Mutation im Verlauf des Alterns oder bleibt sie verhältnismäßig gleich?
3. Führen veränderte ROS-Spiegel zur Aktivierung von Astrocyten und einer nachfolgenden Astrogliose?
4. Ab wann beeinträchtigen die beobachteten zellulären Veränderungen die Lernleistung?
5. Resultiert aus den Veränderungen in der mitochondrialen DNA ein Einfluss auf die Lebenszeitspanne?
6. Wie wirkt sich die Kombination von zwei Mutationen auf die untersuchten Parameter aus?

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Versuche an Tieren und die dabei erfolgten Probenentnahmen wurden nach den Richtlinien und Gesetzen zum Schutz und Gebrauch von Labortieren (§§ 4 und 7 TierSchG) durchgeführt und vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (Tierversuchsgenehmigung 7221.3-1.1-059/12) und vom Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein (Tierversuchsgenehmigung V242-7224. 122-5) genehmigt.

2.1.1 Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden in artspezifischen Ställen bei konstanten Umgebungsbedingungen (Raumtemperatur $23 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $40 \pm 5\%$) gehalten. Durch künstliche Beleuchtung (6.00 bis 18.00 Uhr) wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus vorgegeben. Die Tiere wurden in Kleingruppen von bis zu vier Mäusen in standardisierten Käfigen (26 x 20 x 15 cm) gehalten und einmal wöchentlich in einen neuen Käfig umgesetzt. Wasser und Futter (R/M-H, V1534-0, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.1.2 Altersgruppen und Geschlechterzusammensetzung

Da der Einfluss von mtDNA-Polymorphismen im Alterungsverlauf untersucht werden sollte, wurden, auf Grundlage einer Alterungsstudie des *Jackson Laboratory* (Harrison, 2011) drei Alterszeitpunkte (Abbildung M1) festgelegt: 3 Monate (früh-adult), 12 Monate (spät-adult) und 24 Monate (senil). Die früh-adulte Altersgruppe sollte dem Stand von Menschen Anfang 20 entsprechen und bestand aus Mäusen, deren Entwicklung abgeschlossen, die aber noch nicht von Seneszenz betroffen waren. Sie diente in der vorliegenden Arbeit als Referenzgruppe. Die spät-adulte Altersgruppe entsprach einer Lebensphase, in der seneszente Veränderungen bereits in einigen, aber

nicht in allen, Biomarkern beobachtet werden können. Diese Altersgruppe sollte den Stand von Menschen Mitte 40 abbilden und wurde gewählt, um die Fragestellung zu klären, ob die zu untersuchenden Veränderungen progressiv verlaufen, oder erst in hohem Alter einsetzen. Die senile Altersgruppe stellte eine Lebensphase dar, in der senescente Veränderungen in nahezu allen Biomarkern in allen Tieren der Gruppe auftreten. Diese Altersgruppe sollte Menschen Ende 60 repräsentieren (Abbildung M1).

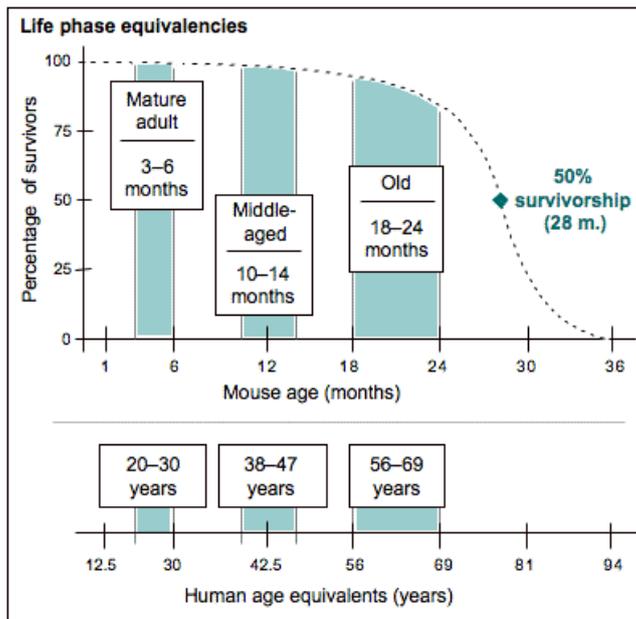


Abbildung M1: Repräsentative Altersangaben für Lebenszeitpunkte von C57BL/6J Mäusen im Vergleich zu Menschen. (Harrison, 2011)

Die genaue Korrelation von Maus- und Menschenalter wird dadurch erschwert, dass Mäuse zu unterschiedlichen Lebenszeiten unterschiedlich schnell altern.

Die Zuordnung zu einer dieser drei Altersgruppen erfolgte innerhalb eines Toleranzrahmens von $\pm 10\%$.

In jeder Alterskohorte waren Tiere beider Geschlechter in einem ausgewogenen Verhältnis vertreten. Alle erhaltenen Daten wurden geschlechtergemischt ausgewertet.

2.1.3 Verwendete Mausstämme

Zur Untersuchung des Einflusses von mitochondrialen Veränderungen auf den Alterungsprozess wurden für die vorliegende Arbeit mehrere conplastische Mausstämme und ein Knockout-Stamm genutzt. Die conplastischen Stämme wurden von Herrn Professor Saleh Ibrahim (Universität Lübeck) als Core Facility im Verbundprojekt *ROSAge – Reactive Oxygen Species and the Dynamics of Ageing* geliefert und vor Ort im zentralen Tierhaus, beziehungsweise im institutseigenen Tierstall nachgezüchtet. Die regelmäßige Genotypisierung der conplastischen Stämme zum Erhalt der eingeführten Polymorphismen wurde ebenfalls durch die Arbeitsgruppe Ibrahim gewährleistet. Der Kontrollstamm C57BL/6J und der Knockout-Stamm B6.129S4-*Ucp2^{tm1Lowl}*/J wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen.

a) Kontrollstämme

Bei allen Untersuchungen wurden zwei Kontrollstämme mitgeführt: Kontrollstamm eins war der etablierte Inzuchtstamm C57BL/6J (nachfolgend als BL6 bezeichnet), welcher auch das Kerngenom für die Generierung der conplastischen Mausstämme lieferte. Als Kontrollstamm zwei wurde C57BL/6J-mt^{AKR/J} (nachfolgend mtAKR) genutzt, welcher in Vorarbeiten von Yu und Kollegen (Yu *et al.*, 2009) mittels phylogenetischer Stammbaumanalyse als Referenzgrundlage für die mitochondriale DNA der conplastischen Mausstämme bestimmt wurde. Die beiden Kontrollstämme unterscheiden sich in der mitochondrialen DNA an Position nt9821, wobei BL6 dort acht und mtAKR neun Adeninwiederholungen aufweist. Diese Veränderung betrifft das Gen *mt-Tr*, welches die mitochondriale Arginin-spezifische tRNA kodiert. Die Position nt9821 liegt im Poly-A-Abschnitt des DHU-Loops (Dihydrouridin-Schleife).

b) Conplastische Mausstämme

Zur phänotypischen Analyse einzelner Punktmutationen in mitochondrial kodierten Genen wurden in der vorliegenden Arbeit conplastische Mausstämme genutzt. Diese zeichnen sich durch eine unterschiedliche Herkunft von Kern- und

Mitochondriengenom aus (Abbildung M2). Dazu wurden Weibchen von Donor-Stämmen (Donor-mt^{Donor}), deren mitochondriales Genom funktionell untersucht werden sollte, mit Männchen eines Empfänger-Stammes (Rezipient-mt^{Rezipient}) gekreuzt. Nach maternaler Rückkreuzung über mindestens zehn Generationen entstanden conplastische Mausstämme (Rezipient-mt^{Donor}).

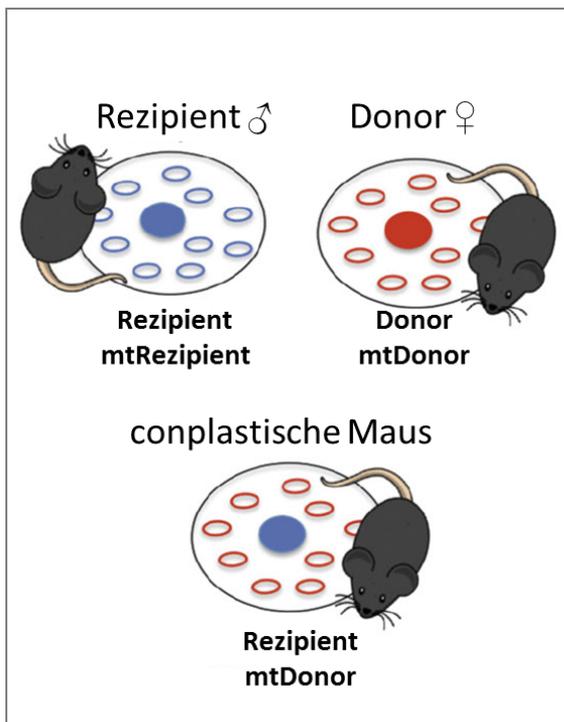


Abbildung M2: Schematische Darstellung zur Generierung von conplastischen Mäusen. (Verändert nach Latorre-Pellicer *et al.*, 2016)

Grundlegend für die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme war die Identifikation von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im mitochondrialen Genom etablierter Inzuchtstämme, welche jeweils auf das Kerngenom von C57BL/6J (BL6) gekreuzt wurden (Yu *et al.*, 2009). Als charakteristisches genotypisches Merkmal tragen die entstandenen conplastischen Stämme jeweils stabile, homoplasmische SNPs in einzelnen Genen für Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen beziehungsweise in der mitochondrial-kodierten argininspezifischen tRNA. Die Zusammensetzung der Genome sowie Loci der mtDNA-Varianten sind in Tabelle M1 aufgeführt, beziehungsweise die von einem SNP betroffenen Gene der conplastischen Versuchsstämme in Abbildung M3 veranschaulicht.

Der Stamm C57BL/6J-mt^{ALR/LtJ} (nachfolgend mit mtALR bezeichnet) trägt im Gen *mt-Nd2* an Position nt4738 eine Veränderung in Form einer Transversion von Cytosin zu Adenin. Diese führt zu einer „*missense*“-Mutation durch einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Methionin. ND2 ist eine von sieben in der mtDNA kodierten Untereinheiten des Atmungskettenkomplex-I-Proteins und bildet zusammen mit den anderen mitochondrial kodierten Untereinheiten den hydrophoben Kern der Transmembrandomäne von Komplex I (UniProt Datenbank, 2017; Voet *et al.*, 2013).

Der Stamm C57BL/6J-mt^{129S1/SvImJ} (nachfolgend als mt129S1 bezeichnet) besitzt eine Veränderung in der Cytochrom-c-Reduktase, dem Atmungskettenkomplex III. Diese wird hervorgerufen durch eine Transition von Adenin zu Guanin an Position nt15124 im Gen *mt-Cyt b*. Durch den resultierenden Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Valin kommt es an dieser Position zu einer „*missense*“-Mutation. *Mt-Cyt b* kodiert die Untereinheit drei, Cytochrom b, von Komplex III und fungiert als Teil der Redoxkomponente dieses Atmungskettenkomplexes (UniProt Datenbank, 2017; Song *et al.*, 2016).

Der Stamm C57BL/6J-mt^{NOD/LtJ} (nachfolgend mtNOD) diene als Modell für eine Veränderung im Atmungskettenkomplex IV, der Cytochrom-c-Oxidase. Dieser Stamm trägt im Gen *mt-CoIII* an Position nt9348 anstelle eines Guanins ein Adenin. Diese Transition führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin und ist somit ebenfalls eine „*missense*“-Mutation. Das Gen *mt-CoIII* kodiert die Untereinheit drei der Cytochrom-c-Oxidase, welche zusammen mit den ebenfalls mitochondrial kodierten Untereinheiten eins und zwei den funktionellen Kernkomplex der Cytochrom-c-Oxidase bildet (UniProt Datenbank, 2017; Rak *et al.*, 2016). Zusätzlich zur Veränderung im Atmungskettenkomplex IV ist der mtNOD-Stamm noch durch einen weiteren SNP gekennzeichnet. Dieser befindet sich an Position nt9821 im mitochondrialen Genom (Yu *et al.*, 2009). Dort gibt es beim mtNOD-Stamm eine Adenin-Insertion im *mt-Tr*-Gen, welches die Nukleotidsequenz der mitochondrial-kodierten Arginin-spezifischen tRNA enthält. Die Insertion befindet sich im Poly-A-Abschnitt des DHU-Loops der tRNA. Somit unterscheidet sich der Stamm mtNOD an zwei Positionen seines mitochondrialen Genoms von den Kontrollstämmen BL6 und mtAKR.

Um einen möglichen mtNOD-Phänotyp auf eine der beiden Mutationen beziehen zu können, wurde als Vergleichsstamm C57BL/6J-mt^{MRL/MpJ} (nachfolgend mtMRL) in die Studien miteinbezogen. Dieser Stamm trägt ebenfalls an Position nt9821 bis zu fünf zusätzliche Adenine, wobei von Sachadyn *et al.* 2008 eine altersabhängige Kumulation

der zusätzlichen Adenine beschrieben wurde. Zusätzlich zeigt sich bei diesem Stamm heteroplasmisch eine T zu C Transition an Position nt3900. Dadurch wird die Stammstruktur der mitochondrial-kodierten Methionin-spezifischen tRNA um ein Nukleotidpaar verlängert und der einzelsträngige Anteil des TΨC-Loops von sieben auf vier Nukleotide verringert (Sachadyn *et al.* 2008).

Der Stamm C57BL/6J-mt^{FVB/NJ} (nachfolgend mtFVB) trägt eine Veränderung in der ATP-Synthase, Komplex V der mitochondrialen Atmungskette. An Position nt7778 führt eine Transversion von Guanin zu Thymin zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Tyrosin und somit zu einer „missense“-Mutation im *mt-Atp8*-Gen. Dieses Gen kodiert für die A6L Untereinheit der F₀-Strukturdomäne und wird als eine der Transmembrandomänen mit der Stabilisierung des gesamten Enzymkomplexes in Verbindung gebracht (UniProt Datenbank, 2017; Jonckheere *et al.*, 2012).

Tabelle M1: Übersicht der verwendeten Mausstämme

Stamm	Bezeichnung	mtDNA Variante	Aminosäure-austausch	Protein
■ BL6	C57BL/6J	nt9821 8A (<i>mt-Tr</i>)	-	mt tRNA ^{Arg}
□ mtAKR	C57BL/6J-mt ^{AKR/J}	nt9821 9A (<i>mt-Tr</i>)	-	mt tRNA ^{Arg}
■ mtALR	C57BL/6J-mt ^{ALR/LJ}	nt4738 A (<i>mt-Nd2</i>)	Leu - Met	Komplex I
■ mt129S1	C57BL/6J-mt ^{129S1/SvlmJ}	nt15124 G (<i>mt-Cyt b</i>)	Ile-Val	Komplex III
■ mtNOD	C57BL/6J-mt ^{NOD/LJ}	nt9348 A (<i>mt-COIII</i>) nt9821 10A (<i>mt-Tr</i>)	Val-Ile	Komplex IV mt tRNA ^{Arg}
■ mtFVB	C57BL/6J-mt ^{FVB/NJ}	nt7778 T (<i>mt-Atp8</i>)	Asp-Tyr	Komplex V
■ mtMRL	C57BL/6J-mt ^{MRL/MpJ}	nt9821>10A (<i>mt-Tr</i>) nt3900 (<i>mt-Tm</i>)	-	mt tRNA ^{Arg} mt tRNA ^{Met}
■ UCP2 ^{-/-}	B6.129S4- <i>Ucp2</i> ^{tm1Lowl/J}	-	-	UCP2- Knockout

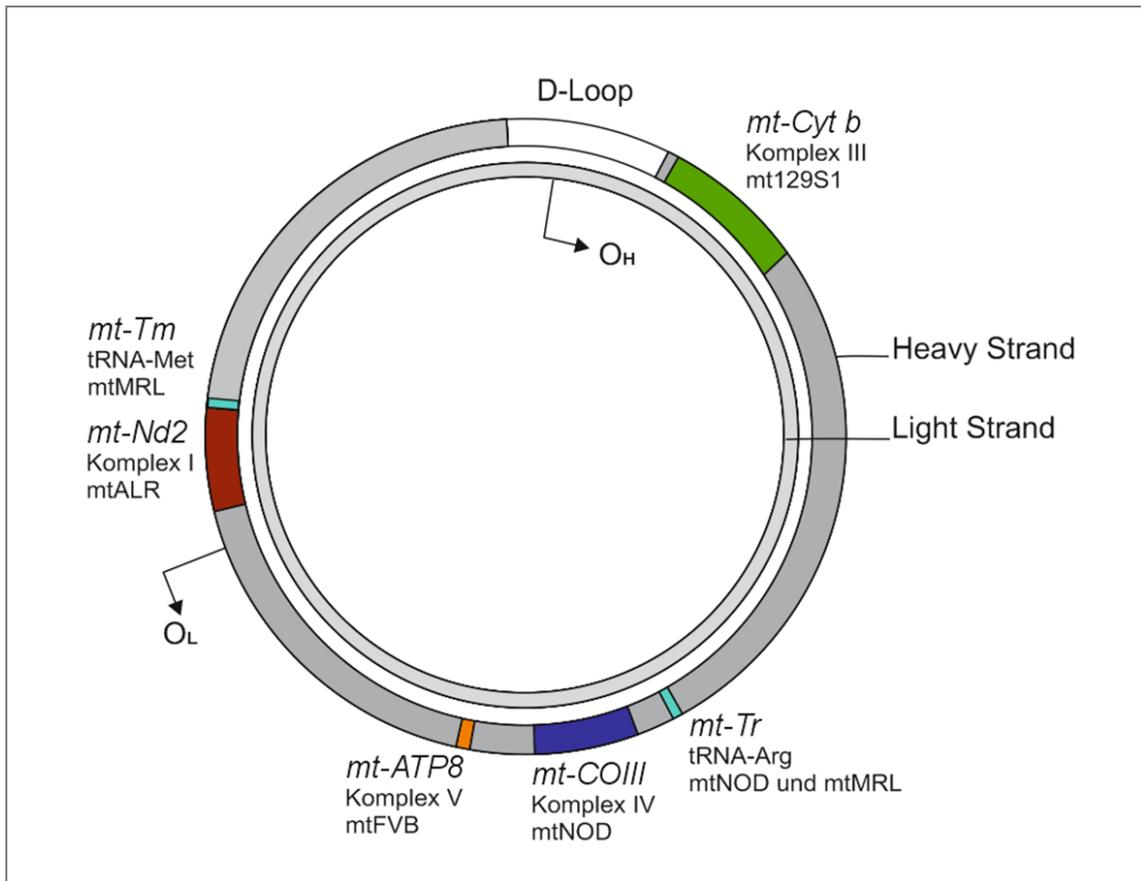


Abbildung M3: Schematische Darstellung der mitochondrialen DNA mit farblicher Kennzeichnung der von einem SNP betroffenen Gene der conplastischen Versuchsstämme. (Verändert nach Taylor und Turnbull, 2005)

Rot : *mt-Nd2*-Gen (Untereinheit von Komplex I; Stamm mtALR); Grün: *mt-Cyt b*-Gen (Untereinheit von Komplex III; Stamm mt129S1); Blau: *mt-COIII*-Gen (Untereinheit von Komplex IV; Stamm mtNOD); Orange: *mt-ATP8*-Gen (Untereinheit von Komplex V; Stamm mtFVB); Hellblau: *mt-Tr*-Gen (Argininspezifische tRNA; Stämme mtNOD und mtMRL); OL: Origin of light-strand replication; OH: Origin of heavy-strand replication; D-Loop: Displacement Loop

c) Knockout-Stamm

Im Vergleich zu den zu charakterisierenden conplastischen Mausstämmen wurde der Knockout-Stamm B6.129S4-*Ucp2*^{tm1Lowl}/J (nachfolgend als *UCP2*^{-/-} bezeichnet) verwendet. Dieser ist ein etablierter Modellstamm für mitochondriale Dysfunktion und daraus resultierende phänotypische Veränderungen (Arsenijevic *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Andrews und Horvath, 2009). Durch einen homozygoten Knockout des *ucp2*-Gens wird das *Uncoupling Protein 2* in den Tieren dieses Stammes nicht exprimiert. Somit entfällt in allen Zellen ein Entkoppeln der mitochondrialen Atmungskette als Schutz vor retrogradem Elektronentransport und damit einhergehender erhöhter ROS-Produktion in den Mitochondrien.

2.2 Präparation von akuten Hirnschnitten

Zur Präparation des Gehirns wurden die Versuchsmäuse mit Diethylether narkotisiert. Das Erlangen eines adäquaten Narkosestadiums wurde mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes getestet, welcher bei entsprechender Narkosetiefe ausbleibt. Daraufhin wurden die Versuchstiere dekapitiert und das Schädeldach eröffnet. Das Gehirn wurde entnommen und in eisgekühlte Präparationslösung überführt, welche zur konstanten Aufrechterhaltung des eingestellten pH-Wertes (pH 7,4) und zur Sättigung mit Sauerstoff fortwährend mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast wurde. Nach Entfernen des Cerebellums wurden die Hemisphären sagittal getrennt, um sowohl Hippocampus- als auch Neocortexschnitte vom selben Versuchstier zu präparieren. Für Hippocampusschnitte wurde anschließend die dorsale, für Neocortexschnitte die caudale Seite nach unten in einer mit eisgekühlter carbogenbegaster Präparationslösung befüllten Vibratomkammer fixiert. Beide Hemisphären wurden mit einem Vibratom bei 80 Hz Schwingungsfrequenz des Klingenhalters in Scheiben aufgeschnitten (Hippocampusschnitte 400 µm dick, Neocortexschnitte 500 µm dick), wobei die obersten und untersten Schichten verworfen wurden. Die Schnitte wurden in Behälter mit eisgekühlter carbogenbegaster Messlösung (pH 7,4) überführt, wo sie submers auf Nylonnetzen lagen und sich über einen Ruhezeitraum von eineinhalb Stunden langsam an Raumtemperatur anglichen. Auf diese Weise konnte von den präparierten Versuchsmäusen jeweils ein Schnitt zur Färbung von mitochondrialem Superoxid, einer zur Färbung von astrozyten- und neuronenspezifischen Markerproteinen und zwei Schnitte für weitere Messungen (Messung exzitatorischer postsynaptischer Feldpotenziale; nicht Bestandteil dieser Arbeit) genutzt werden.

Tabelle M2: Zusammensetzung der Präparations- und Messlösung

	Präparationslösung	Messlösung
Natriumchlorid	87 mM	124 mM
Natriumhydrogencarbonat	25 mM	26 mM
Kaliumchlorid	2,5 mM	6 mM
Natriumdihydrogenphosphat	1,25 mM	1,25 mM
D-Glucose	10 mM	10 mM
Sucrose	75 mM	-
Calciumchlorid	0,5 mM	2,5 mM
Magnesiumchlorid	7 mM	1,5 mM
Osmolarität (mOsmol/l H ₂ O)	326-328	304-312

2.3 Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid

Zur Untersuchung von Veränderungen in der Entstehung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies wurde der Gehalt an mitochondrialem Superoxid bestimmt. Da Superoxid die primäre Form der in Mitochondrien entstehenden ROS darstellt (Turrens, 2003), sollte eine Veränderung in der ROS-Bildung hier am ehesten manifestiert sein. Die Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid erfolgte an akuten Hirnschnittpräparaten, welche mit MitoSOX Red gefärbt wurden. Dazu wurden die Schnitte in Färbekammern mit carbogenbegaster Messlösung überführt, wo sie submers auf Nylonnetzen lagen und vital angefärbt werden konnten. MitoSOX Red ist ein Hydroethidium-Derivat, das auf Grund einer Triphenylphosphonium-Gruppe die Mitochondrienmembran passiert und in der Mitochondrienmatrix angereichert wird. Dort reagiert es spezifisch mit Superoxid zu 2-Hydroxyethidium, welches nach Bindung an die mitochondriale DNA fluoresziert. (Robinson *et al.*, 2006; Mukhopadhyay *et al.*, 2007). Zum Anfärben des mitochondrialen Superoxids wurden die Schnittpräparate 15 Minuten in Messlösung mit 1 μ M MitoSOX Red bei Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift über 10 Minuten in Messlösung, ebenfalls lichtgeschützt und bei Raumtemperatur. Die gefärbten Präparate wurden anschließend direkt in 3,7 prozentigem Paraformaldehyd für mindestens 24 Stunden fixiert. Zum Anfertigen von 10 μ m dünnen Kryoschnitten mussten die Präparate zunächst für weitere 24 Stunden in 1 x PBS mit 30 % Sucrose bei 4 °C inkubiert werden, bevor sie bei -50 °C eingefroren und zur Lagerung bei -80°C überführt wurden. Dabei erfolgten alle genannten Schritte ebenfalls lichtgeschützt. Zum Schneiden der Präparate wurden diese mindestens 24 Stunden vor dem Schneidevorgang auf eine Temperatur von -20°C gebracht. Der Schneidevorgang erfolgte in einem Kryostaten der Firma Leica. Bei einer Kammertemperatur von -26 °C und einer Objektträgertemperatur von -21°C wurden die Hirnschnitte in dünnere 10 μ m aufgeschnitten und auf Glasobjektträger überführt. Anschließend wurden die Schnitte mit ProLong® Gold Antifade eingedeckt und dabei simultan mit DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff zur DNA-Markierung, gegengefärbt. Die Analyse der MitoSOX Red Färbungen erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Fluoview FV10i, Olympus). Dazu wurden je Alters- und Stammgruppe von fünf Versuchstieren jeweils fünf Schnitte aufgenommen. Pro Schnitt wurden insgesamt sechs Aufnahmen, drei mit 60 x und drei mit 120 x Vergrößerung, erstellt: Bei

Hippocampusschnitten jeweils in den drei Regionen *Cornu Ammonis* 1 (CA1), CA3 und *Gyrus dentatus* (DG); bei Neocortexschnitten jeweils zwei Aufnahmen der Schichten I/II, III/IV und V/VI. Dabei wurden zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe Wellenlängen im Bereich des jeweiligen Absorptionsmaximums (MitoSOX Red 495 nm, DAPI 359 nm) sowie konstante Laserkonfigurationen und Expositionszeiten verwendet. Als Negativkontrollen dienten Schnitte, welche ohne vorherige MitoSOX Red-Inkubation durch Eindecken mit ProLong® Gold Antifade nur DAPI gefärbt waren. Zur Auswertung der Aufnahmen wurde das Programm Olympus FLUOVIEW Version 3.0a genutzt, womit die Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid und vom DAPI-Signal als relative Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt wurde. Um die unterschiedlichen Zellzahlen der einzelnen Aufnahmen zu berücksichtigen, wurde anschließend das MitoSOX Signal auf die Fluoreszenzintensität von DAPI bezogen.

Tabelle M3: Zusammensetzung des PBS-Puffers

	1 x PBS
Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Natriumdihydrogenphosphat	8 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 mM
pH	7,4

2.4 Quantifizierung von astrozyten- und neuronenspezifischen Markerproteinen mittels Immunhistochemie

Um mögliche mutations- oder altersbedingte Veränderungen in der Zellzusammensetzung untersuchen zu können, wurde das Verhältnis von Astrocyten und Neuronen zueinander semiquantitativ über Markerproteine bestimmt. Dazu wurden Hirnschnitte auf ihren GFAP- (Glial fibrillary acidic protein) und NeuN-Gehalt (Neuronal Nuclei) untersucht. GFAP ist ein Intermediärfilament in Astrozyten, welche den Haupttyp von Gliazellen des Zentralnervensystems (ZNS) von Säugetieren bilden. Astrozyten haben umfangreiche Kontroll- und Homöostasefunktionen und zeigen bei akuten ZNS Traumata, Ischämien und neurodegenerativen Prozessen einen reaktiven Phänotyp, welcher unter anderem durch einen Anstieg ihres GFAP-Gehalts gekennzeichnet ist (Hol und Pekny, 2015). NeuN ist ein lösliches Protein, welches im

Zellkern und in geringerem Maße auch im umgebenden Zellplasma von postmitotischen Neuronen zu finden ist (Mullen *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2009).

Akute Hirnschnittpräparate wurden in 3,7 prozentigem Paraformaldehyd für mindestens 24 Stunden fixiert und anschließend, wie unter 2.3 beschrieben, kryokonserviert. Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Hirnschnitte am Kryostaten in dünnere 20 µm aufgeschnitten und auf Glasobjektträger überführt. Zu Beginn des Färbeprozesses mussten die Schnitte für zehn Minuten mit eisgekühltem Aceton entfettet und kurz in 1 x PBS (Zusammensetzung siehe Tabelle M3) gewaschen werden. Nach Blockierung für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (1 ml TRIS mit 10 % BSA, 1 Tropfen Triton X-100) wurden die Schnitte in 1 x PBS gespült und für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper (anti NeuN; Tabelle M5), welcher 1:400 in Carrierlösung (1 % NGS in 1 x PBS) verdünnt wurde, inkubiert. Nach einem Waschschrift (dreimal fünf Minuten mit 1 x PBS) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (anti GFAP; Tabelle M5), ebenfalls 1:400 verdünnt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurden die zu färbenden Schnitte mit dem dritten Antikörper (Sekundäantikörper zu NeuN, Cy3-gekoppelt; Tabelle M5) und wieder nach einem Waschschrift mit dem vierten Antikörper (Sekundäantikörper zu GFAP, Cy5-gekoppelt; Tabelle M5) jeweils für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Antikörperverdünnung von 1:2000 inkubiert. Da der dritte und vierte Antikörper mit Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren, erfolgten diese Färbeschritte lichtgeschützt. Anschließend wurden die Schnitte mit ProLong® Gold Antifade eingedeckt. Die Analyse der GFAP-NeuN Färbungen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (Leica DMI 6000B). Dazu wurden je Alters- und Stammgruppe von fünf Versuchstieren jeweils zwei Schnitte in 63 x Vergrößerung aufgenommen. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wurden Wellenlängen im Bereich des jeweiligen Absorptionsmaximums (Cy3 550 nm, Cy5 650 nm) sowie konstante Laserkonfigurationen und Expositionszeiten verwendet. Als Negativkontrollen dienten Schnitte, welche ohne vorherige Inkubation mit den Primäantikörpern (erster und zweiter Antikörper) nur mit den Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundäantikörpern (dritter und vierter Antikörper) und durch Eindecken mit ProLong® Gold Antifade mit DAPI gefärbt waren. Zur Auswertung der Aufnahmen wurde das Programm Leica LAS X genutzt, womit die Quantifizierung von GFAP und NeuN über die relativen Fluoreszenzintensitäten der farbstoffgekoppelten Sekundäantikörper bestimmt wurde. Pro Hippocampusschnitt wurden die drei

Regionen CA1, CA3 und DG ausgewertet. Um eine mögliche Veränderung im Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen zu erkennen, wurde anschließend das Verhältnis aus GFAP- zu NeuN-Signal gebildet.

2.5 Versuche zum räumlichen Lernvermögen im Morris Water Maze (MWM)

Das Morris Water Maze wurde ursprünglich 1984 von Morris als ein Versuchsaufbau zum räumlichen Lernen von Ratten beschrieben (Morris, 1984). Dabei soll das Versuchstier die Position einer verborgenen Plattform mit Hilfe entfernter optischer Merkmale in einem Wasserbecken erlernen. Ein möglicher Lernerfolg manifestiert sich nach aufeinander folgenden Versuchswiederholungen in sukzessive kürzer werdenden Latenzzeiten beziehungsweise Schwimmstrecken bis zum Auffinden der Plattform. In der Folgezeit wurden viele verschiedene Variationen des ursprünglichen MWM Versuches etabliert. Dabei kann je nach Versuchsparadigma der Einfluss bestimmter Teilbereiche und Kerngebiete des Gehirns auf die Gedächtnisbildung untersucht werden (D'Hooge *et al.*, 2001). Ziel der Lernversuche der vorliegenden Arbeit war es, das Lernvermögen vor allem an zentraler Stelle der Gedächtniskonsolidierung, im Hippocampus, zu erfassen.

Die Versuchstiere wurden zwei Tage vor Beginn der Versuchsreihe in separate Käfige vereinzelt und in einen gesonderten Versuchsraum zunächst zur Habituation überführt, wobei sowohl die klimatischen- als auch versorgungstechnischen Bedingungen exakt an die vorherigen Haltungsbedingungen der Tiere angepasst wurden. Dabei wurden die Mäuse einer allgemeinen Gesundheitsprüfung unterzogen. Nur Mäuse, die grundsätzlich gesund wirkten und keine offenen Wunden hatten, wurden in den MWM Versuch aufgenommen. Da das Sehvermögen beim räumlichen Lernen eine entscheidende Rolle spielt, wurde dieses mit einem einfachen SLAG-Greiftest (SLAG - *Slow angled-descent forepaw grasping*) überprüft (Gil-Pagés *et al.*, 2013). Mäuse, die zum Beispiel in Folge einer Linsentrübung ein gestörtes Sehvermögen aufwiesen, wurden vom Lernversuch ausgeschlossen. Die Zusammenstellung der jeweiligen Versuchsgruppen und die Durchführung wurde jeweils durch zwei verschiedene Personen bearbeitet, sodass eine unvoreingenommene Datenaufnahme in jeder Versuchsreihe gegeben war.

Die Durchführung der Lernversuche erfolgte an acht aufeinander folgenden Tagen. Eine Versuchsreihe startete mit Tag 0, bei dem die Mäuse zur Habituation an das Versuchsbecken zweimal für 60 Sekunden ohne Plattform ins Wasser gesetzt wurden. In den darauffolgenden sieben Tagen fanden die eigentlichen Lernversuche statt, bei denen jedes Tier pro Tag nacheinander sechs Schwimmversuche über maximal 60 Sekunden durchlief. Wurde die Plattform innerhalb dieser Zeit nicht selbständig vom Versuchstier gefunden, wurde es vorsichtig per Hand dorthin geleitet. Am Ende jedes Einzelversuchs verblieb das jeweilige Tier für 30 Sekunden auf der Plattform, um den Ort mit seiner Position im Raum zu verknüpfen. Anschließend konnte die Maus für 60 Sekunden in einem neutralen Käfig ausruhen, bevor der nächste Durchlauf begann (Abbildung M4).

Die Versuchstiere wurden während der Lerndurchläufe mit einer Kamera aufgezeichnet, welche zentral über dem Wasserbecken angebracht war. Da alle verwendeten Mausstämme eine schwarze Fellfarbe aufwiesen, wurde das Wasser mit zwei Litern Milch weiß eingefärbt, um den Kontrast für die Kameraaufzeichnung zu verstärken. Die Aufnahmen wurden mit der EthoVision 3.1 Software ausgewertet.

Die Durchführung der Lernversuche erfolgte in einem runden Wasserbecken (110 cm Durchmesser, 50 cm Höhe), welches in einem abgetrennten Bereich des Versuchsraumes fest installiert war. An den Wänden des Bereiches waren geometrische Symbole angebracht, die als charakteristische Merkmale zur Orientierung im Raum dienen sollten. Das Wasserbecken war in vier Quadranten (N, O, S, W) eingeteilt, wobei im Zentrum jedes Quadranten eine 7,5 cm große Plattform befestigt werden konnte (Abbildung M4). Das Wasserbecken wurde für die Schwimmversuche so mit 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) warmem Wasser gefüllt, dass sich diese Plattform einen Zentimeter unter der Wasseroberfläche befand. Die Position der Plattform wurde vor Beginn einer Versuchsreihe für jedes Tier auf einen der Quadranten festgelegt.

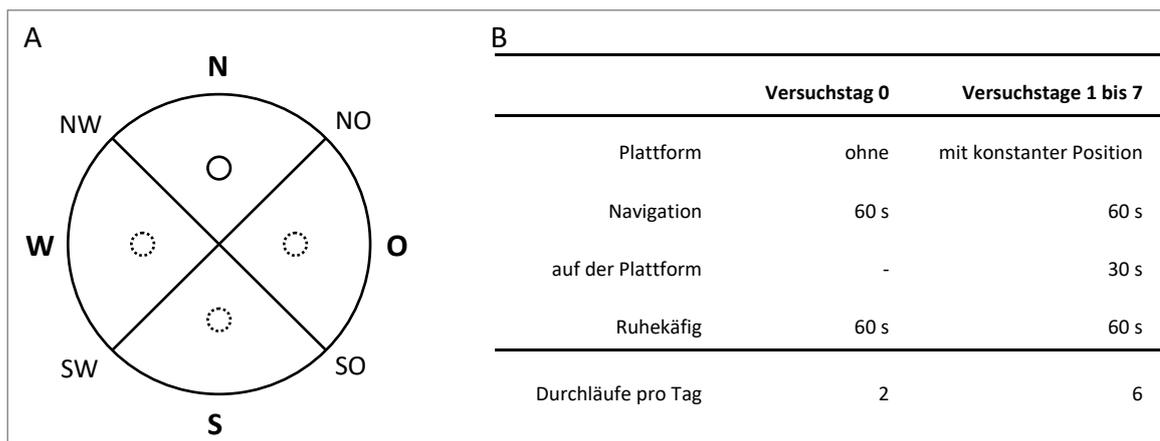


Abbildung M4: Schematische Darstellung zum Ablauf der Lernversuche im Morris Water Maze.

A: Einteilung des Wasserbeckens in Quadranten (N, O, S, W). Die Himmelsrichtungen (N, NO, O, SO, S, SW, W, NW) kennzeichnen die acht möglichen Startpositionen.

B: Tabellarische Übersicht des angewandten Versuchsparadigmas.

Die Tiere wurden randomisiert an acht verschiedenen Positionen (N, NO, O, SO, S, SW, W, NW) am Beckenrand eingesetzt, da die Tiere die Position der Plattform und nicht den Weg dorthin erlernen sollten. Je nach Einsetzposition variierte damit die minimal zu schwimmende Strecke und wurde zur vergleichenden Beurteilung der Lernleistung bei der Analyse der erhaltenen Daten jeweils von der Gesamtdistanz abgezogen (Vorhees *et al.*, 2006). Da die Lernleistung für verschiedene Altersgruppen untersucht werden sollte, wurde als Beurteilungsparameter die geschwommene Strecke und nicht die Latenzzeit genutzt, um Effekte von altersbedingten Unterschieden der Physis zu minimieren.

2.6 Erfassung der mittleren Lebensdauer

Zur Erfassung der Lebenszeitspanne wurden die Mäuse bis zu ihrem natürlichen Lebensende wie unter 2.1 beschrieben im Tierstall gehalten. Dabei wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen äußerlich untersucht. Zeigte ein Tier mehr als eines der folgenden Krankheitssymptome oder Verhaltensweisen, galt dies als Abbruchkriterium (Yuan *et al.*, 2009): Unfähigkeit, Nahrung oder Wasser zu sich zu nehmen; schwere Lethargie; schwere Ganginstabilität; großer Gewichtsverlust in kurzer Zeit; eiternde oder blutende Geschwüre; stark vergrößertes Abdomen.

2.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit IBM SPSS Statistics Version 22 durchgeführt. Als Grenzwert für die Irrtumswahrscheinlichkeit (α -Fehler) wurde ein Wert von fünf Prozent festgelegt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant gewertet und die Nullhypothese abgelehnt.

Da alle Stichprobenanzahlen kleiner als 20 waren, erfolgte der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben mit dem nichtparametrischen Testverfahren Mann-Whitney-U Test (statistische Beratung am Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung, Universitätsmedizin Rostock). Bei diesem Testverfahren entfällt eine vorherige Testung auf Normalverteilung. Die entsprechenden Werte sind in Diagrammen als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Die Ergebnisse der Versuche zum Lernverlauf im Morris Water Maze wurden zur Evaluierung intergruppaler Signifikanzen mittels Varianzanalyse statistisch ausgewertet. Dazu wurden die Daten initial mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Bei der Varianzanalyse wurde die geschwommene Strecke als abhängige Variable auf die Faktoren Versuchstag und Gruppenzugehörigkeit (Stamm oder Altersgruppe) getestet und bei festgestellter intergruppaler Signifikanz mit einem anschließenden Post-Hoc-Test nach Tukey ausgewertet. Die Ergebnisse der Water Maze Versuche sind in Linien-Diagrammen als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt. Des Weiteren wurde bei den Watermaze-Versuchen ausgewertet, wieviele Tiere je Stamm und Altersgruppe den Versuch über alle Durchläufe an sieben aufeinanderfolgenden Tagen geschafft haben, beziehungsweise bei wievielen Tieren der Versuch aus körperlichen Gründen abgebrochen werden musste. Dazu wurden die entsprechenden Daten in Kontingenztafeln eingetragen und zunächst global mittels Chi-Quadrat-Test untersucht. Dabei festgestellte signifikante Unterschiede wurden anschließend paarweise mit dem Exakten Test nach Fisher weiter ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Form von Histogrammen dargestellt, die den prozentualen Anteil an der jeweiligen Altersgruppe zeigen.

Zum Vergleich der Lebenszeitdaten wurde der Log-Rang-Test (Mantel-Cox-Test) angewandt. Die Ergebnisse sind in Form von Kaplan-Meier-Diagrammen dargestellt.

2.8 Chemikalien und Geräte

Alle normalen Laborverbrauchsmaterialien, wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Transferpipetten, wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, von der Sarstedt AG & Co. aus Nümbrecht, Deutschland bezogen.

Tabelle M4: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	LAB_Scan analytical sciences; Gliwice, Polen
Aptamil Milchpulver	Milupa Nutricia GmbH; Bad Homburg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde Industriegase; Hamburg, Deutschland
Diethyl Ether, Anhydrous	Mallinckrodt Baker; Deventer, USA
Ethanol (70 %)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Glucose	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland
Immersionsöl Typ-F IMMOIL-F30CC	Olympus; Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat (K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Normal goat serum (NGS)	Gibco Life Technologies GmbH; Eggenstein, Deutschland
Paraformaldehyd (37%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland
Sucrose	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland
Tissue-Tek [®] O.C.T. [™] Compound	Sakura Finetek Germany GmbH; Staufen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland

Tabelle M5: Bezugsquellen der verwendeten Antikörper und Zellfarbstoffe

Antikörper / Zellfarbstoff	Hersteller
MitoSOX Red [®]	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
ProLong [®] Gold Anifade (DAPI)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Cy3 goat anti rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Cy5 goat anti mouse IgG	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
anti GFAP mouse ab10062, monoklonal, IgG2b	Abcam plc; Cambridge, Großbritannien
anti NeuN rabbit ab104225, polyklonal, IgG	Abcam plc; Cambridge, Großbritannien

Tabelle M6: Bezugsquellen der verwendeten Geräte, Materialien und Software

Bezeichnung	Hersteller
BSC-BU Brain Slice Chamber	Harvard Apparatus Inc.; Holliston, USA
Cryostat Leica CM 3050S	Leica Biosystems GmbH; Nussloch, Deutschland
Deckgläschen 24 x 60 mm	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; Braunschweig, Germany
Etho Vision 3.1	Noldus Deutschland Nord; Solingen, Deutschland
Feinwaage MC1 Analytic AC 120 S	Sartorius AG; Göttingen, Deutschland
IBM SPSS Statistics 24	IBM Deutschland GmbH; Ehningen, Deutschland
Integralslice 7550 MM Vibratom	Campden Instruments Ltd.; Loughborough, Großbritannien
Kaltlichtquelle KL 750	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Kamera SD II	Panasonic GmbH; Hamburg, Deutschland
Leica DMI 6000B Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Leica EL 6000 Kompaktlichtquelle	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Leica LAS X Mikroskopsoftware	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost [®] PLUS	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; Braunschweig, Germany
Olympus Fluoview FV10i konfokales Fluoreszenzmikroskop	Olympus; Hamburg, Deutschland
Olympus Fluoview Ver. 3.0a Auswertesoftware	Olympus; Hamburg, Deutschland
Osmometer Automatic	Knauer GmbH; Berlin, Deutschland
pH-Meter CG 840	Schott-Geräte GmbH; Mainz, Deutschland
Reinstwasseranlage PURELAB Ultra	ELGA LabWater; Celle, Deutschland
RET-GS Magnetrührer	IKA Labortechnik GmbH; Staufen, Deutschland
Tissue-Tek [®] Cryomold Standard 25 x 20 x 5 mm	Sakura Finetek Germany GmbH; Staufen, Deutschland

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten wurden im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojektes *ROSAge – Reactive Oxygen Species and the Dynamics of Ageing* erhoben. In der Arbeitsgruppe Neurophysiologie wurden die Mausstämme hinsichtlich altersspezifischer Veränderungen im Gehirn untersucht, wobei die wissenschaftlichen Beiträge wie folgt verteilt waren:

Die Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid und die von astrozyten- und neuronenspezifischen Markerproteinen erfolgte ausschließlich durch die Autorin der vorliegenden Arbeit. Ebenso wurden die Lebenszeitdaten der Versuchstiere durch die Autorin erhoben.

Die *in vivo* Messungen zum Lernvermögen wurden größtenteils von Herrn Dr. rer. nat. Johannes Mayer durchgeführt. Dabei hat er die Methode zusammen mit der Autorin der vorliegenden Arbeit etabliert und wurde bei der Durchführung der Versuche vielfach von der Autorin unterstützt. Die daraus resultierenden Datensätze wurden mit ausdrücklicher Genehmigung von Herrn Dr. Mayer in die vorliegende Arbeit mit aufgenommen, um sie im Zusammenhang mit den histologischen Färbungen und den Überlebensdaten diskutieren zu können.

Die Auswertung, grafische Darstellung, statistische Analyse und Interpretation der in der vorgelegten Arbeit präsentierten Daten erfolgte ausschließlich durch die Autorin.

3.1 Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid

Mitochondriales Superoxid wurde für alle Mausstämme in allen Altersgruppen von jeweils fünf Tieren bestimmt. Dazu wurden pro Tier von fünf Hirnschnitten jeweils zwei Aufnahmen in den hippocampalen Regionen CA1, CA3 und DG beziehungsweise in den Cortexschichten I/II, III/IV und V/VI angefertigt und vermessen. Die daraus erhaltenen Daten (30 Datenpunkte je Tier und Hirngebiet) wurden für das jeweilige Tier gemittelt, sodass für die statistische Auswertung die n-Zahl je Stamm und Altersgruppe fünf betrug.

3.1.1 Altersverlauf der Kontrollstämme

Der Gehalt an mitochondrialem Superoxid im Hippocampus der Kontrollmäuse stieg bei beiden Stämmen, BL6 und mtAKR, mit zunehmendem Alter an (Abbildung R1).

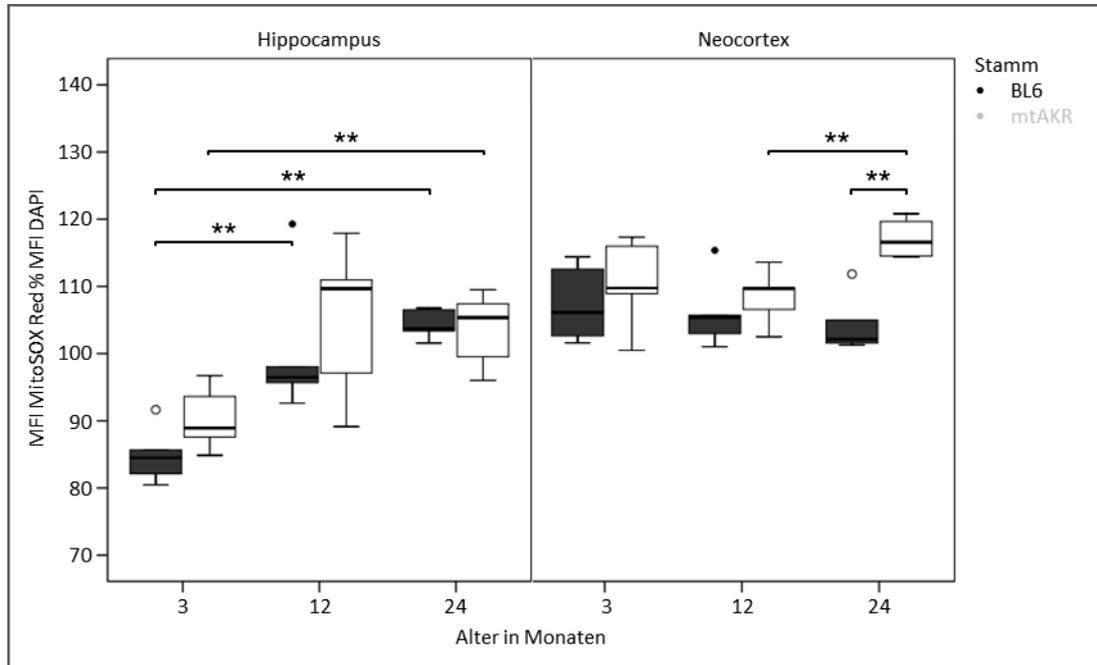


Abbildung R1: Mitochondriales Superoxid der Kontrollstämme BL6 und mtAKR.

Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid im Hippocampus (links) und Neocortex (rechts) der Kontrollstämme BL6 (schwarz) und mtAKR (weiß). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Superoxid-Farbstoffes MitoSOX Red relativ zur MFI des DNA-Farbstoffes DAPI in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Beim BL6-Stamm war dieser Anstieg sowohl von 3 zu 12 Monaten (+ 12 % MFI MitoSOX Red), als auch von 3 zu 24 Monaten (+ 20 %) signifikant. Abbildung R2 zeigt dazu beispielhaft fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

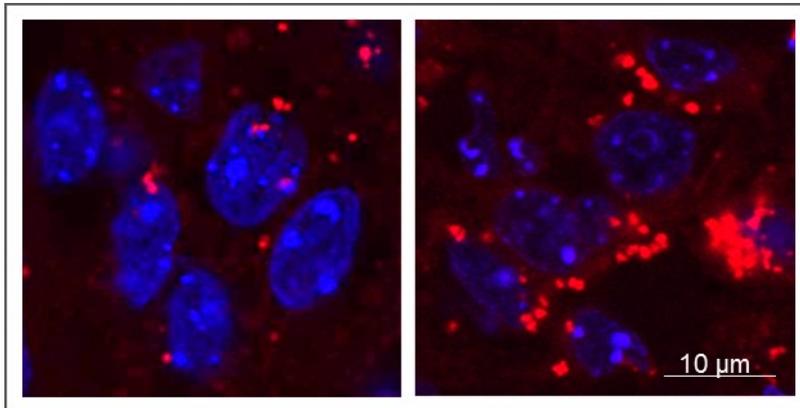


Abbildung R2: Mitochondriales Superoxid im Hippocampus des Kontrollstammes BL6.
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen der CA3-Region im Hippocampus von 3- (links) und 24-Monate (rechts) alten Tieren des Kontrollstammes BL6.
Rot = Superoxid-Farbstoff MitoSOX Red; blau = DNA-Farbstoff DAPI; 120 x Vergrößerung

Beim mtAKR-Stamm zeigte sich in der 12-Monats-Gruppe eine hohe Streubreite, sodass hier nur die Veränderung von 3 zu 24 Monaten (+ 16 % MFI MitoSOX Red) signifikant war. Zwischen den Kontrollstämmen gab es pro Altersgruppe keine signifikanten Unterschiede.

Im Neocortex zeigte sich beim BL6-Kontrollstamm bereits in der jüngsten Altersgruppe ein im Vergleich zum Hippocampus höherer Gehalt an mitochondrialem Superoxid. Ausgehend davon wurde mit zunehmendem Alter kein weiterer Anstieg festgestellt (Abbildung R1). Bei mtAKR gab es, ebenfalls ausgehend von einem Niveau, welches im Hippocampus erst bei älteren Tieren erreicht wurde, einen signifikanten Unterschied zwischen 12 und 24 Monaten (+ 7 % MFI MitoSOX Red). Zur 3-Monats-Gruppe bestand, vermutlich auf Grund der relativ großen Spannweite, kein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich beider Kontrollstämmen zeigte sich in der Altersgruppe 24-Monate bei mtAKR ein um 15 % MFI MitoSOX Red signifikant erhöhter Gehalt an mitochondrialem Superoxid im Neocortex.

3.1.2 Altersverlauf der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette

Die Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette wiesen in ihrem Altersverlauf ein heterogenes Bild in Bezug auf mitochondriales Superoxid auf (Abbildungen R3 und R5).

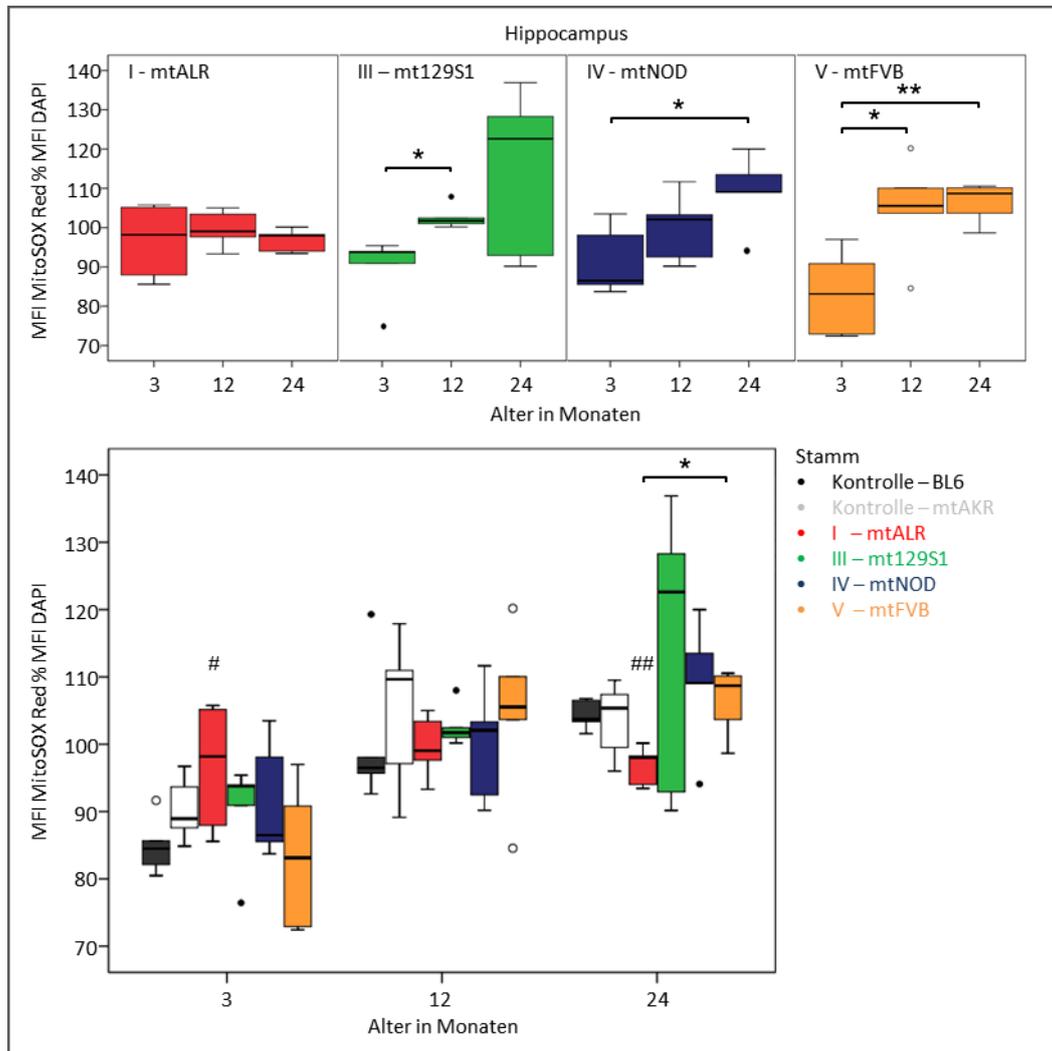


Abbildung R3: Mitochondriales Superoxid im Hippocampus der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.

Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid im Hippocampus der conplastischen Stämme mtALR (rot), mt129S1 (grün), mtNOD (blau) und mtFVB (orange). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Superoxid-Farbstoffes MitoSOX Red relativ zur MFI des DNA-Farbstoffes DAPI in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Die obere Reihe zeigt die altersbedingte Veränderung jeweils innerhalb der Stämme. Das untere Diagramm zeigt den Vergleich zu den Kontrollstämmen BL6 (schwarz) und mtAKR (weiß), wobei hier aus Übersichtsgründen nur die Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe gekennzeichnet sind. Mann-Whitney-U Test; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; # signifikanter Unterschied zur gleichaltrigen BL6-Kontrolle

Im Hippocampus zeigten die Stämme mt129S1 (Mutation in Komplex III), mtNOD (Komplex IV) und mtFVB (Komplex V) einen altersabhängigen signifikanten Anstieg

an Superoxid (Abbildung R3). Bei mt129S1 und mtFVB fand dieser bereits zwischen den Altersgruppen 3- und 12-Monate statt (mt129S1 + 8 % MFI MitoSOX Red; mtFVB + 26 % MFI MitoSOX Red), bei mtNOD erst zur 24-Monate Gruppe (+ 17 % MFI MitoSOX Red). Der mtALR-Stamm (Komplex I) wies im Hippocampus in allen untersuchten Altersgruppen einen konstanten Gehalt an Superoxid auf.

Im Vergleich mit den Kontrollen zeigte nur der mtALR-Stamm signifikante Unterschiede: In der Altersgruppe 3-Monate war das mitochondriale Superoxid gegenüber der BL6-Kontrolle um 14 % MFI MitoSOX Red erhöht, in der Altersgruppe 24-Monate um 6 % MFI MitoSOX Red verringert (Abbildungen R3 und R4).

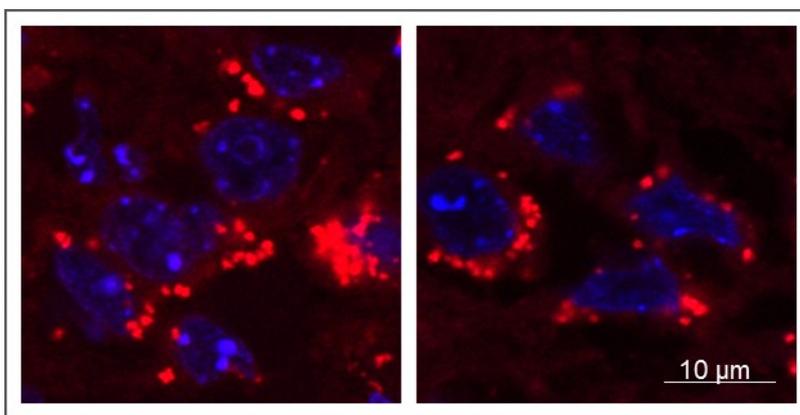


Abbildung R4: Mitochondriales Superoxid im Hippocampus von 24-Monate alten Versuchstieren. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen der CA3-Region im Hippocampus von BL6 (links) und mtALR (rechts) Tieren der Altersgruppe 24 Monate. Rot = Superoxid-Farbstoff MitoSOX Red; blau = DNA-Farbstoff DAPI; 120 x Vergrößerung

Im Neocortex zeigten nur die Stämme mt129S1 und mtNOD einen altersabhängigen signifikanten Anstieg an mitochondrialem Superoxid (Abbildung R5). Bei mt129S1 begann dieser wiederum bereits zwischen den Altersgruppen 3- und 12-Monate (+ 13 % MFI MitoSOX Red), bei mtNOD erneut erst zur 24-Monate Gruppe (+ 11 % MFI MitoSOX Red). Sowohl der mtALR-Stamm, als auch der mtFVB-Stamm, wiesen im Neocortex in allen untersuchten Altersgruppen einen konstanten Gehalt an Superoxid auf.

Im Vergleich mit den Kontrollen war das mitochondriale Superoxid, wie in Abbildung R5 ersichtlich, in der Altersgruppe 12-Monate bei mtALR, mt129S1 und mtFVB, und in der Altersgruppe 24-Monate bei allen vier Stämmen mit Mutation in einem der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe gegenüber der BL6-Kontrolle erhöht (mtALR + 10 %, mt129S1 + 26 %, mtNOD + 24 % und mtFVB + 11 % MFI MitoSOX Red).

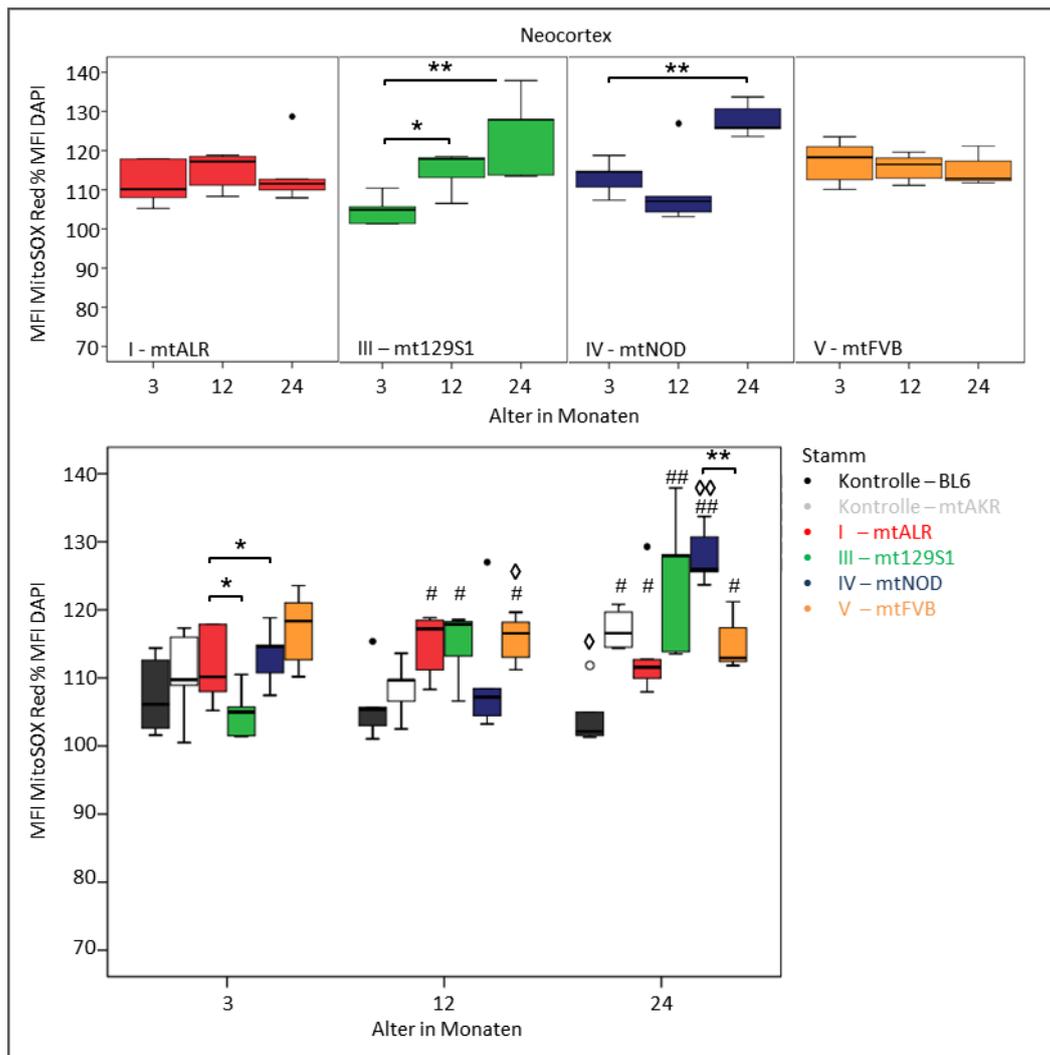


Abbildung R5: Mitochondriales Superoxid im Neocortex der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.

Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid im Neocortex der conplastischen Stämme mtALR (rot), mt129S1 (grün), mtNOD (blau) und mtFVB (orange). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Superoxid-Farbstoffes MitoSOX Red relativ zur MFI des DNA-Farbstoffes DAPI in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Die obere Reihe zeigt die altersbedingte Veränderung jeweils innerhalb der Stämme. Das untere Diagramm zeigt den Vergleich zu den Kontrollstämmen BL6 (schwarz) und mtAKR (weiß), wobei hier aus Übersichtsgründen nur die Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe gekennzeichnet sind. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # signifikanter Unterschied zur gleichalten BL6-Kontrolle; ◇ signifikanter Unterschied zur gleichalten mtAKR-Kontrolle

3.1.3 Altersverlauf der UCP2-Knockout-Mutante

Die UCP2-Knockout-Mutante wies im Hippocampus in allen untersuchten Altersgruppen einen konstanten Gehalt an Superoxid auf. Im Vergleich mit der BL6-Kontrolle war dieser im Alter von 3 Monaten um 17 % signifikant erhöht, in der Altersgruppe 24-Monate um 10 % MFI MitoSOX Red verringert (Abbildung R6).

Im Neocortex zeigte sich bei der UCP2-Knockout-Mutante ein bogenförmiger Verlauf des Superoxid Niveaus mit signifikanten Unterschieden zwischen allen untersuchten Altersgruppen, wobei in der 12-Monate Gruppe der höchste und in der 24-Monate Gruppe der niedrigste Superoxidgehalt gemessen wurde. Gegenüber der BL6-Kontrolle war das mitochondriale Superoxid bei den 12-Monate alten UCP2^{-/-}-Tieren um 16 % MFI MitoSOX Red signifikant erhöht (Abbildung R6).

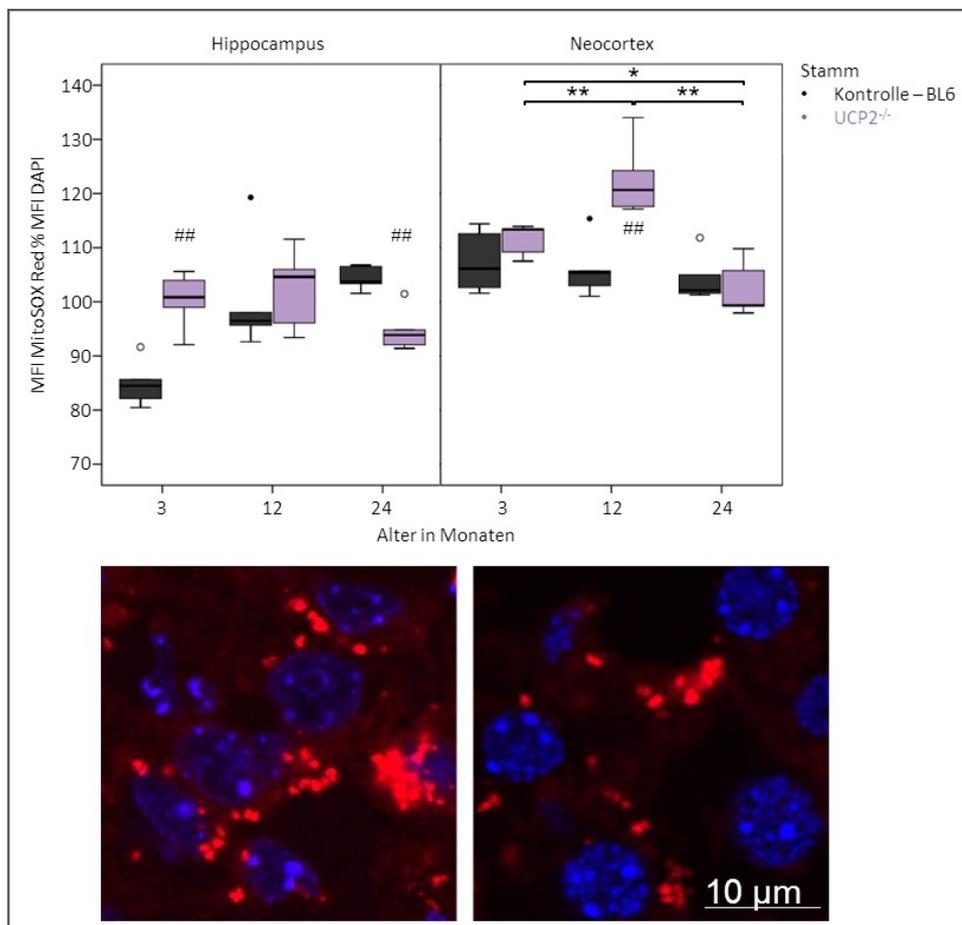


Abbildung R6: Mitochondriales Superoxid der Stämme UCP2^{-/-} und BL6.

Obere Reihe: Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid im Hippocampus (links) und Neocortex (rechts) der UCP2-Knockout-Mutante (lila) im Vergleich zum Kontrollstamm BL6 (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Superoxid-Farbstoffes MitoSOX Red relativ zur MFI des DNA-Farbstoffes DAPI in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # signifikanter Unterschied zur gleichaltrigen BL6-Kontrolle
Untere Reihe: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen der CA3-Region im Hippocampus von BL6 (links) und UCP2^{-/-} (rechts) Tieren der Altersgruppe 24 Monate.
Rot = Superoxid-Farbstoff MitoSOX Red; blau = DNA-Farbstoff DAPI; 120 x Vergrößerung

3.1.4 Altersverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA

Bei der Untersuchung des mitochondrialen Superoxids in den Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA konnte nur für den mtNOD-Stamm (10 A) ein signifikanter altersabhängiger Anstieg des Superoxid Gehaltes festgestellt werden (Abbildung R7).

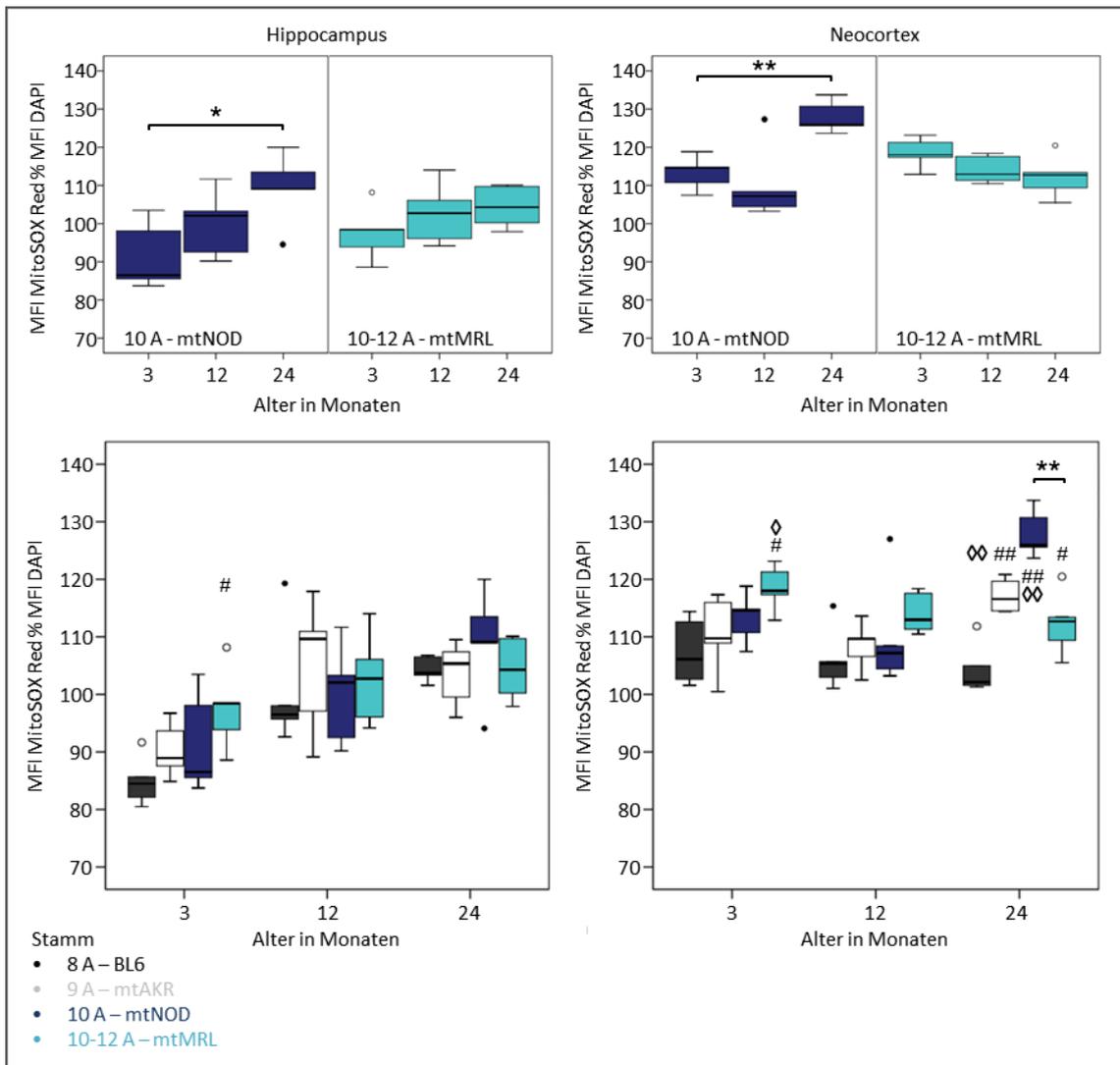


Abbildung R7: Mitochondriales Superoxid der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.

Quantifizierung von mitochondrialem Superoxid im Hippocampus (links) und Neocortex (rechts) der conplastischen Stämme mtNOD (blau) und mtMRL (türkis). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Superoxid-Farbstoffes MitoSOX Red relativ zur MFI des DNA-Farbstoffes DAPI in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Die obere Reihe zeigt die altersbedingte Veränderung jeweils innerhalb der Stämme. Die unteren Diagramme zeigen den Vergleich zu den Kontrollstämmen BL6 (schwarz) und mtAKR (weiß), wobei hier aus Übersichtsgründen nur die Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe gekennzeichnet sind. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # signifikanter Unterschied zur gleichalten BL6-Kontrolle; ◇ signifikanter Unterschied zur gleichalten mtAKR-Kontrolle

Dieser entwickelte sich sowohl im Hippocampus (+ 17 % MFI MitoSOX Red im Vergleich 3- zu 24-Monate), als auch im Neocortex (+ 11 % MFI MitoSOX Red im Vergleich 3- zu 24-Monate). Der mtMRL-Stamm (10-12 A) zeigte in keinem der beiden Hirnbereiche eine altersabhängige Veränderung des mitochondrialen Superoxids.

Im Vergleich mit den Kontrollen BL6 (8 A) und mtAKR (9 A) zeigte mtMRL in der Altersgruppe 3-Monate sowohl im Hippocampus (+ 14 % MFI MitoSOX Red im Vergleich zu BL6) als auch im Neocortex (+ 12 %) ein signifikant erhöhtes Superoxid Niveau. In der Altersgruppe 12-Monate erschienen beide Stämme unauffällig, wohingegen im Alter von 24 Monaten beide Stämme im Neocortex einen erhöhten Superoxidgehalt aufwiesen (mtNOD + 24 % und mtMRL + 11 % MFI MitoSOX Red im Vergleich zu BL6). Dabei lag der hohe Superoxid Gehalt des mtNOD-Stammes auch signifikant höher als der des mtMRL-Stammes (Abbildungen R7 und R8).

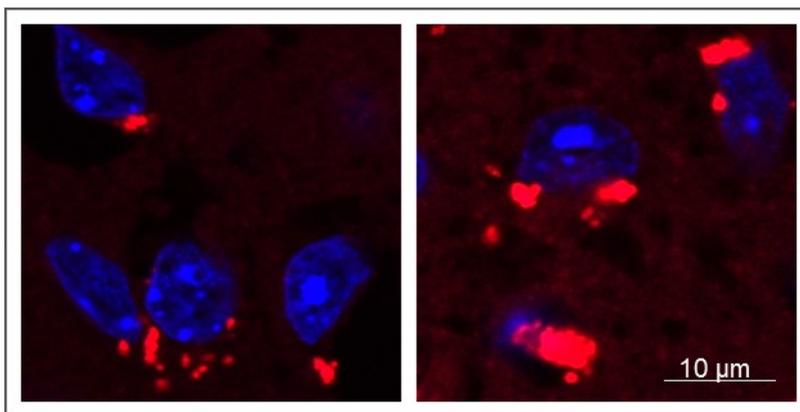


Abbildung R8: Mitochondriales Superoxid im Neocortex von 24-Monate alten Versuchstieren. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen des Neocortex aus dem Bereich Lamina I/II von BL6 (links) und mtNOD (rechts) Tieren der Altersgruppe 24 Monate. Rot = Superoxid-Farbstoff MitoSOX Red; blau = DNA-Farbstoff DAPI; 120 x Vergrößerung

3.2 Quantifizierung astrozyten- und neuronenspezifischer Markerproteine

Die Quantifizierung von astrozyten- und neuronenspezifischen Markerproteinen wurde für alle Mausstämme in allen Altersgruppen für jeweils fünf Tiere durchgeführt. Dazu wurden von zwei Hirnschnitten pro Tier jeweils Aufnahmen in den hippocampalen Regionen CA1, CA3 und DG angefertigt und vermessen. Die daraus erhaltenen Daten (sechs Datenpunkte je Tier) wurden für das jeweilige Tier gemittelt, sodass für die statistische Auswertung die n-Zahl je Stamm und Altersgruppe fünf betrug.

3.2.1 Altersverlauf der Kontrollstämme

Das Verhältnis von GFAP zu NeuN im Hippocampus der Kontrollmäuse stieg bei beiden Stämmen, BL6 und mtAKR, mit zunehmendem Alter nur leicht an (Abbildung R9). Lediglich bei mtAKR war dieser Anstieg im Vergleich von 3 zu 12 Monaten signifikant. Zwischen den Kontrollstämmen gab es in den untersuchten Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede.

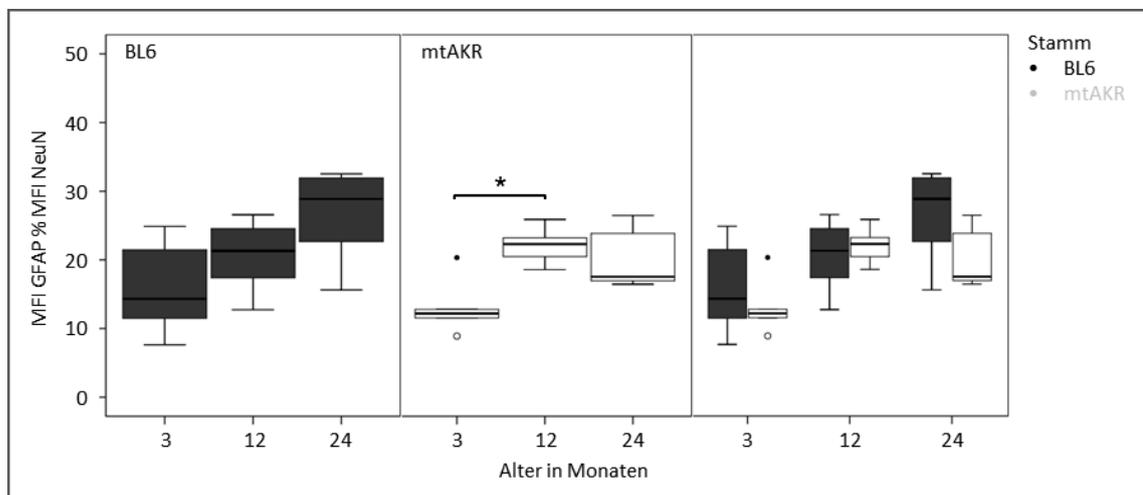


Abbildung R9: GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der Kontrollstämme.

Quantifizierung von GFAP und NeuN im Hippocampus der Kontrollstämme BL6 (links), mtAKR (Mitte) und der Vergleich (rechts) beider Kontrollen (BL6 schwarz, mtAKR weiß) in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des GFAP-Signals relativ zur MFI des NeuN-Signals in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$

3.2.2 Altersverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette

Die Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette wiesen, ebenso wie beim Superoxid Gehalt, auch in Bezug auf ihr GFAP-zu-NeuN-Verhältnis ein sehr heterogenes Bild auf (Abbildung R10).

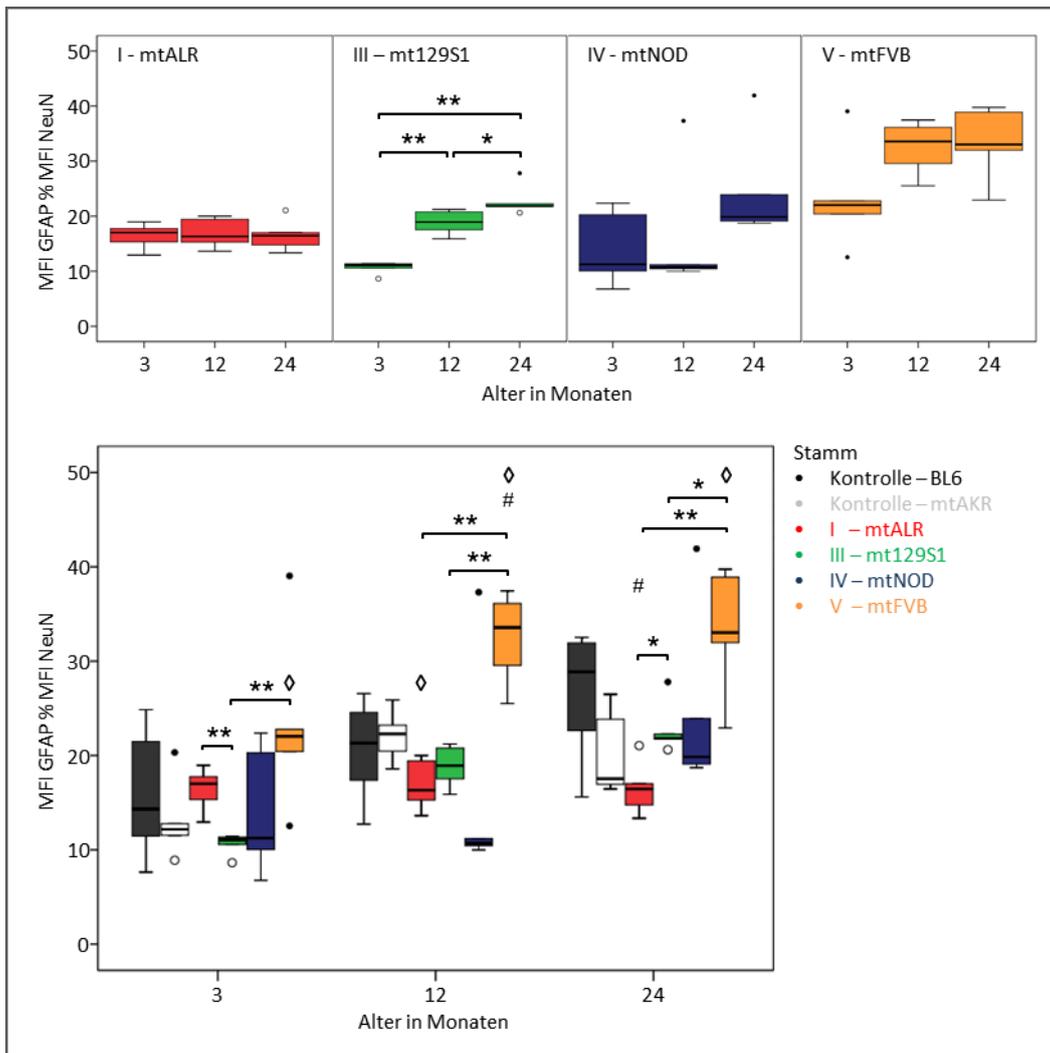


Abbildung R10: GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.

Quantifizierung von GFAP und NeuN im Hippocampus der conplastischen Stämme mtALR (rot), mt129S1 (grün), mtNOD (blau) und mtFVB (orange). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des GFAP-Signals relativ zur MFI des NeuN-Signals in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Die obere Reihe zeigt die altersbedingte Veränderung jeweils innerhalb der Stämme. Das untere Diagramm zeigt den Vergleich zu den Kontrollstämmen BL6 (schwarz) und mtAKR (weiß), wobei hier aus Übersichtsgründen nur die Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe gekennzeichnet sind. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # signifikanter Unterschied zur gleichalten BL6-Kontrolle; ◇ signifikanter Unterschied zur gleichalten mtAKR-Kontrolle

Der mtALR-Stamm (Komplex I Mutation) zeigte keinerlei altersabhängige Veränderung des GFAP-Signals. Mt129S1 (Komplex III) wies hingegen einen deutlich signifikanten altersabhängigen Anstieg des GFAP-Signals auf, welcher vor allem zwischen den Altersgruppen 3- und 12-Monate stattfand (+ 8 % MFI GFAP). Bei den Stämmen mtNOD (Komplex IV) und mtFVB (Komplex V) konnten keine signifikanten altersabhängigen Veränderungen im GFAP-zu-NeuN-Verhältnis festgestellt werden, wobei sich bei beiden, wie aus Abbildung R7 ersichtlich, tendenziell ein Anstieg des GFAP-Signals andeutete. Dieser schien bei mtNOD zwischen den Altersgruppen 12- und 24-Monate (+ 9 % MFI GFAP), bei mtFVB zwischen den Altersgruppen 3- und 12-Monate (+ 12 % MFI GFAP) zu liegen. Darüber hinaus fiel der mtFVB-Stamm in allen Altersgruppen durch ein höheres GFAP-zu-NeuN-Verhältnis auf.

Im Vergleich mit den Kontrollstämmen bestanden nur bei mtALR und mtFVB signifikante Unterschiede (Abbildung R10): MtALR wies in den Altersgruppen 12- und 24-Monate einen geringeren Gehalt an GFAP als einer der Kontrollstämmen auf (12-Monate: - 6 % MFI GFAP im Vergleich zu mtAKR; 24-Monate: - 13 % MFI GFAP im Vergleich zu BL6). MtFVB zeigte dagegen einen signifikant höheren GFAP-Gehalt als die Kontrollstämmen (3-Monate: + 10 %; 12-Monate: + 12 %; 24-Monate: + 15 % MFI GFAP jeweils im Vergleich zu mtAKR).

3.2.3 Altersverlauf der UCP2-Knockout-Mutante

Die UCP2-Knockout-Mutante wies, wie aus Abbildung R11 ersichtlich, im Hippocampus eine signifikante altersabhängige Verringerung des GFAP-Signal auf (3- zu 24-Monate: - 9 % MFI GFAP). Diese, zur BL6-Kontrolle gegenläufige, Veränderung resultierte in einem zur Kontrolle deutlich verringerten GFAP-zu-NeuN-Verhältnis in der Altersgruppe 24-Monate (- 19 % MFI GFAP).

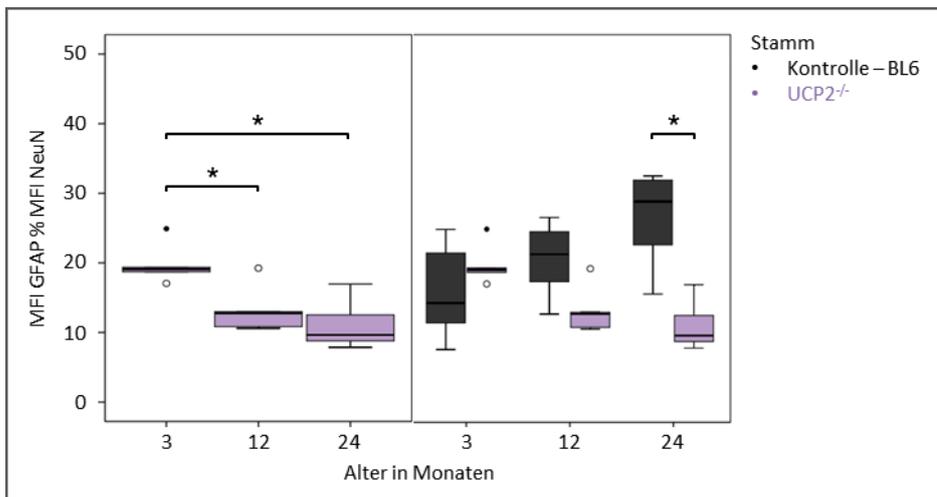


Abbildung R11: GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der UCP2-Knockout-Mutante.

Quantifizierung von GFAP und NeuN im Hippocampus der UCP2-Knockout-Mutante (links) und der Vergleich zur Kontrolle (rechts: BL6 schwarz, UCP2^{-/-} lila) in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des GFAP-Signals relativ zur MFI des NeuN-Signals in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$

3.2.4 Altersverlauf der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA

Die Untersuchung des GFAP-zu-NeuN-Verhältnisses in den Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA zeigte nur für den mtMRL-Stamm (10-12 A) einen signifikanten altersabhängigen Anstieg des GFAP Gehaltes (Abbildung R12). Dieser fand zwischen den Altersgruppen 12- und 24-Monate statt (+ 34 % MFI GFAP). Bei mtNOD war tendenziell ebenfalls zwischen diesen beiden Altersgruppen ein GFAP-Anstieg zu sehen, allerdings nicht signifikant. Im Vergleich zu den Kontrollen BL6 und mtAKR fiel nur das stark signifikant erhöhte GFAP Signal von mtMRL (+ 20 % MFI GFAP im Vergleich zu BL6; + 31 % MFI GFAP im Vergleich zu mtAKR) in der Altersgruppe 24-Monate auf.

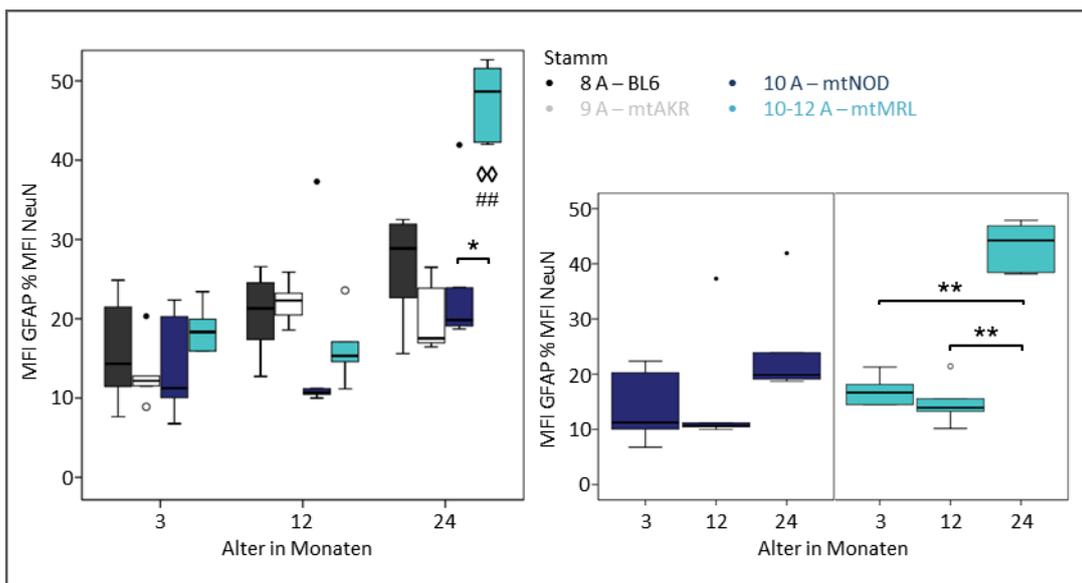


Abbildung R12: GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.

Quantifizierung von GFAP und NeuN im Hippocampus der conplastischen Stämme mtNOD (blau) und mtMRL (türkis). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des GFAP-Signals relativ zur MFI des NeuN-Signals in Form von Box-Whisker-Plots mit eingezeichnetem Median. Das linke Diagramm zeigt den Vergleich zu den Kontrollstämmen BL6 (schwarz) und mtAKR (weiß), wobei hier aus Übersichtsgründen nur die Signifikanzen innerhalb einer Altersgruppe gekennzeichnet sind. Das mittlere und das rechte Diagramm zeigen die altersbedingte Veränderung jeweils innerhalb der Stämme. Mann-Whitney-U Test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # signifikanter Unterschied zur gleichalten BL6-Kontrolle; ◇ signifikanter Unterschied zur gleichalten mtAKR-Kontrolle

3.3 Räumliches Lernvermögen im Morris Water Maze

Zur *in vivo* Beurteilung des räumlichen Lernvermögens der Versuchstiere wurden diese im Morris Water Maze analysiert. Dabei kam es methodisch bedingt zu leicht variierenden n-Zahlen in den untersuchten Gruppen, weshalb diese im Nachfolgenden zu jeder Abbildung separat angegeben sind.

3.3.1 Lernverlauf der Kontrollstämme

Bei beiden Kontrollstämmen, BL6 und mtAKR, nahm das räumliche Lernvermögen mit zunehmendem Alter ab.

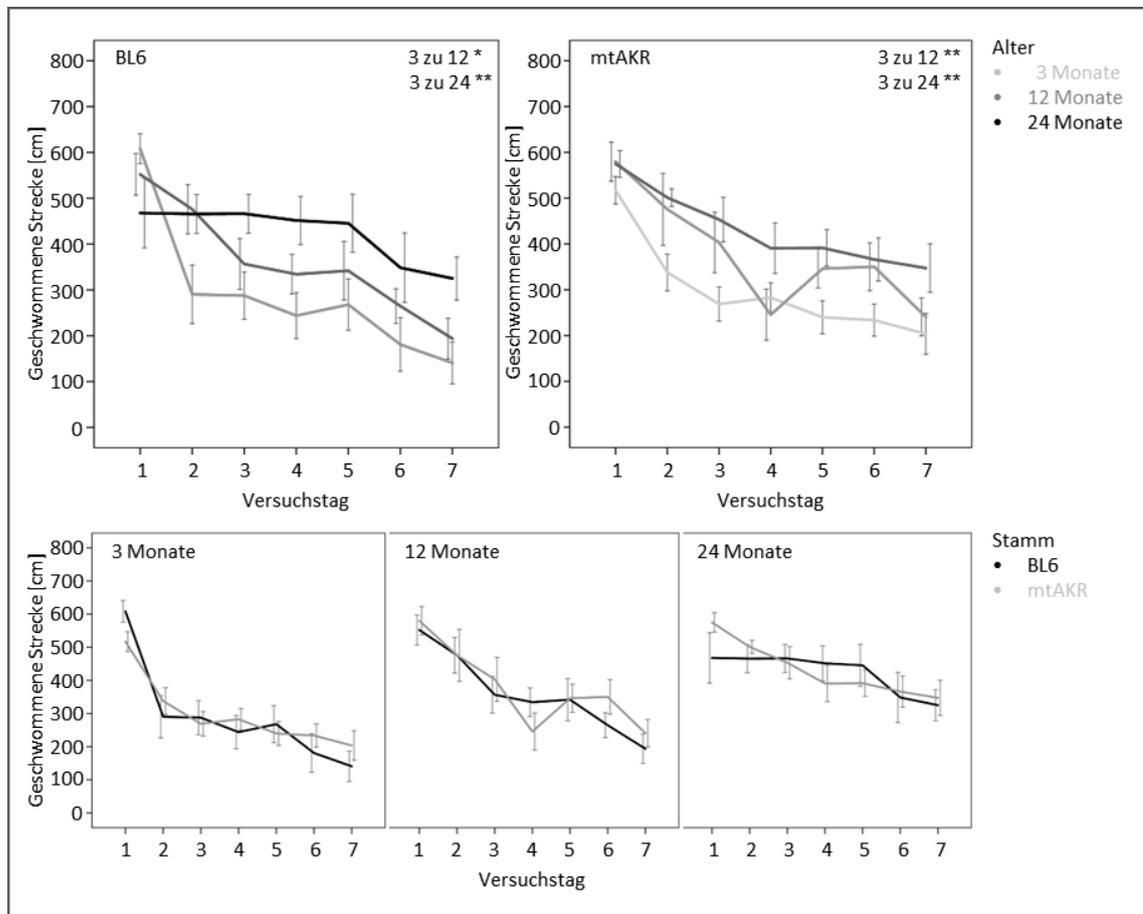


Abbildung R13: Ergebnisse der Kontrollstämme aus den Lernversuchen im MWM.

Lernverläufe der Kontrollstämme BL6 und mtAKR. Das linke (BL6) und das rechte (mtAKR) Diagramm der oberen Reihe zeigen die Lernverläufe innerhalb eines Stammes in den untersuchten Altersgruppen, die untere Reihe zeigt die Lernverläufe innerhalb der Altersgruppen im Vergleich der beiden Stämme (BL6 schwarz, mtAKR grau). Dargestellt ist die geschwommene Strecke in Form von Liniendiagrammen mit angegebenem Standardfehler über die Versuchstage eins bis sieben.

n-Zahlen (3;12;24 Monate): BL6 (10;14;9); mtAKR (17;9;12); Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test (Tukey); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Wie aus den oberen Teilabbildungen von R13 ersichtlich, unterschieden sich bei beiden Kontrollstämmen sowohl die 12- als auch die 24-Monate Gruppe signifikant von den 3-Monate alten Tieren. Besonders deutlich fielen diese Unterschiede zwischen der 3- und der 24-Monate Gruppe aus, wobei die senile Gruppe bei den BL6-Tieren selbst am letzten Versuchstag noch mehr als die doppelte Schwimmstrecke im Vergleich zu den früh-adulten Tieren benötigte. Die 3-Monate Gruppe zeigte bereits ab Versuchstag zwei einen deutlichen Lernerfolg, welcher bei den älteren Kohorten sehr viel langsamer einsetzte, bei den senilen BL6-Tieren sogar erst ab Versuchstag sechs.

Im Vergleich innerhalb der Altersgruppen (untere Teilabbildungen von R13) gab es keine Unterschiede zwischen den Kontrollstämmen BL6 und mtAKR.

3.3.2 Lernverlauf der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette

Ebenso wie bei den vorangegangenen Untersuchungen ergab sich auch für den Lernverlauf der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette ein heterogenes Bild:

Wie Abbildung R14 zeigt, gab es beim mtALR-Stamm (Mutation in Komplex I) eine Auffälligkeit gegenüber den Kontrollen in der Altersgruppe 12-Monate. Dort war der Lernerfolg der Versuchstiere deutlich verschlechtert und die Lernkurve lag konstant oberhalb der Kontrollstämmen. Die mtALR-Tiere ($422 \text{ cm} \pm 80 \text{ cm}$) schwammen selbst am letzten Versuchstag mehr als doppelt so viel zusätzliche Strecke wie die BL6-Tiere ($194 \text{ cm} \pm 44 \text{ cm}$), brauchten also deutlich länger zur Orientierung im Versuchsbecken. Die Altersgruppen 3- und 24-Monate waren unauffällig gegenüber den Kontrollen. Innerhalb des mtALR-Stammes gab es zwischen jeder der drei untersuchten Altersgruppen signifikante Unterschiede, wobei die Lernentwicklung in der Altersgruppe 12-Monate insgesamt schlechter ausfiel als in der 24-Monate Gruppe.

Die 3-Monate alte Kohorte unterschied sich durch einen deutlich besseren Erfolg beim räumlichen Lernen (zusätzliche Schwimmstrecke an Tag sieben: 3-Monate mit $231 \text{ cm} \pm 51 \text{ cm}$; 24-Monate mit $360 \text{ cm} \pm 40 \text{ cm}$; 12-Monate mit $422 \text{ cm} \pm 80 \text{ cm}$).

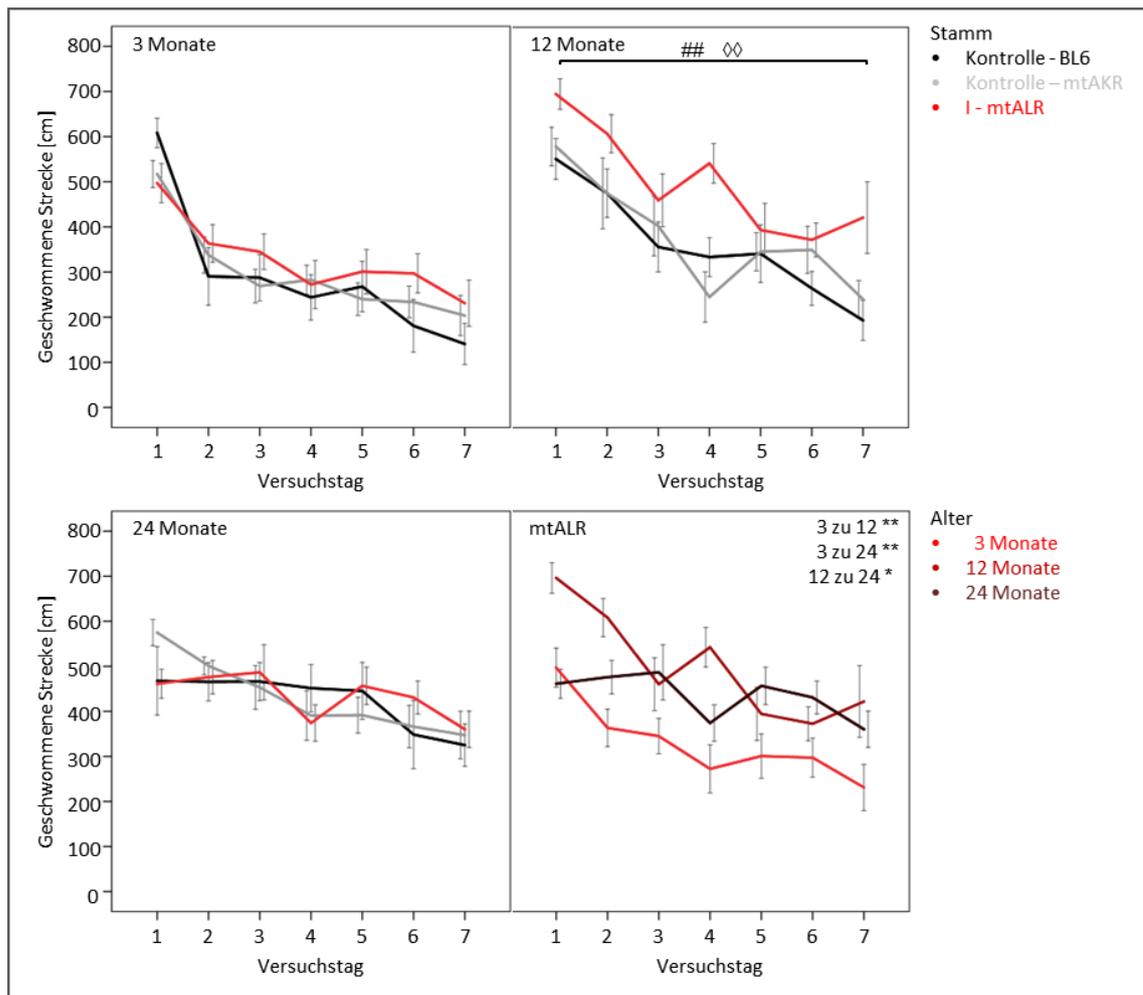


Abbildung R14: Ergebnisse des mtALR-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.

Die obere Reihe und das Diagramm unten links zeigen die Lernverläufe innerhalb der Altersgruppen 3, 12 und 24 Monate im Vergleich zu den Kontrollen BL6 (schwarz) und mtAKR (grau), das Diagramm unten rechts zeigt die Lernverläufe innerhalb des mtALR-Stammes in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die geschwommene Strecke in Form von Liniendiagrammen mit angegebenem Standardfehler über die Versuchstage eins bis sieben. n-Zahlen (3;12;24 Monate): mtALR (11;9;8); BL6 (10;14;9); mtAKR (17; 9; 12); Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test (Tukey); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # signifikanter Unterschied zur gleichalten BL6-Kontrolle; ◇ signifikanter Unterschied zur gleichalten mtAKR-Kontrolle

Bei mt129S1 (Mutation in Komplex III) ergab sich nur ein geringer altersabhängiger Unterschied im räumlichen Lernen der Versuchstiere, wobei sich die 12-Monate Gruppe signifikant von der 24-Monate Gruppe unterschied. Die Lernkurve der 3-Monate Gruppe lag zwischen denen der beiden höheren Altersgruppen und war zu keiner signifikant verschieden (Abbildung R15).

Im Vergleich mit den Kontrollstämmen zeigte mt129S1 ein signifikant schlechteres Lernvermögen in der Gruppe der früh-adulten Tiere. Obwohl die Lernkurve auf gleichem Niveau wie die der Kontrollen startete, setzte der Lernerfolg deutlich langsamer ein. Am letzten Versuchstag benötigten 3-Monate alte mt129S1-Tiere ($287 \text{ cm} \pm 42 \text{ cm}$) im Mittel etwa eine doppelt so große Schwimmstrecke zur Orientierung wie die BL6-Tiere ($141 \text{ cm} \pm 46 \text{ cm}$).

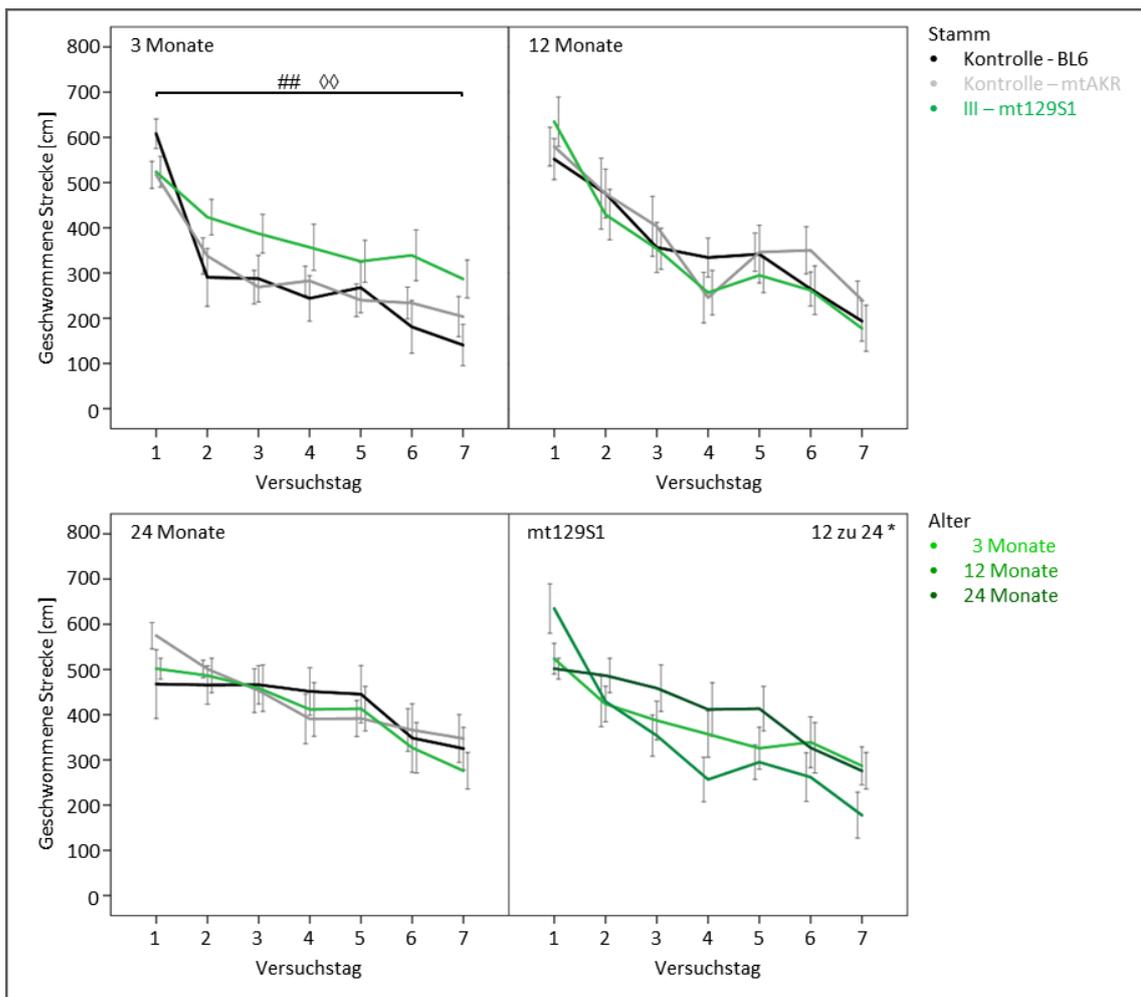


Abbildung R15: Ergebnisse des mt129S1-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.

Die obere Reihe und das Diagramm unten links zeigen die Lernverläufe innerhalb der Altersgruppen 3, 12 und 24 Monate im Vergleich zu den Kontrollen BL6 (schwarz) und mtAKR (grau), das Diagramm unten rechts zeigt die Lernverläufe innerhalb des mt129S1-Stammes in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die geschwommene Strecke in Form von Liniendiagrammen mit angegebenem Standardfehler über die Versuchstage eins bis sieben. n-Zahlen (3;12;24 Monate): mt129S1 (11;11;12); BL6 (10;14;9); mtAKR (17; 9; 12); Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test (Tukey); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # signifikanter Unterschied zur gleichalten BL6-Kontrolle; ◇ signifikanter Unterschied zur gleichalten mtAKR-Kontrolle

Der mtNOD-Stamm (Mutation in Komplex IV) zeigte keine signifikanten Veränderungen im räumlichen Lernen, weder zwischen den untersuchten Altersgruppen noch zu den Kontrollen (Abbildung R16). Auffällig bei diesem Stamm war allerdings die schlechte physische Verfassung der 24-Monate alten Tiere (siehe auch Abbildung R18), die dazu führte, dass in dieser Kohorte nur ein Tier den Lernversuch komplett absolvierte und somit keine Aussage über das Lernvermögen in dieser Altersgruppe getroffen werden kann.

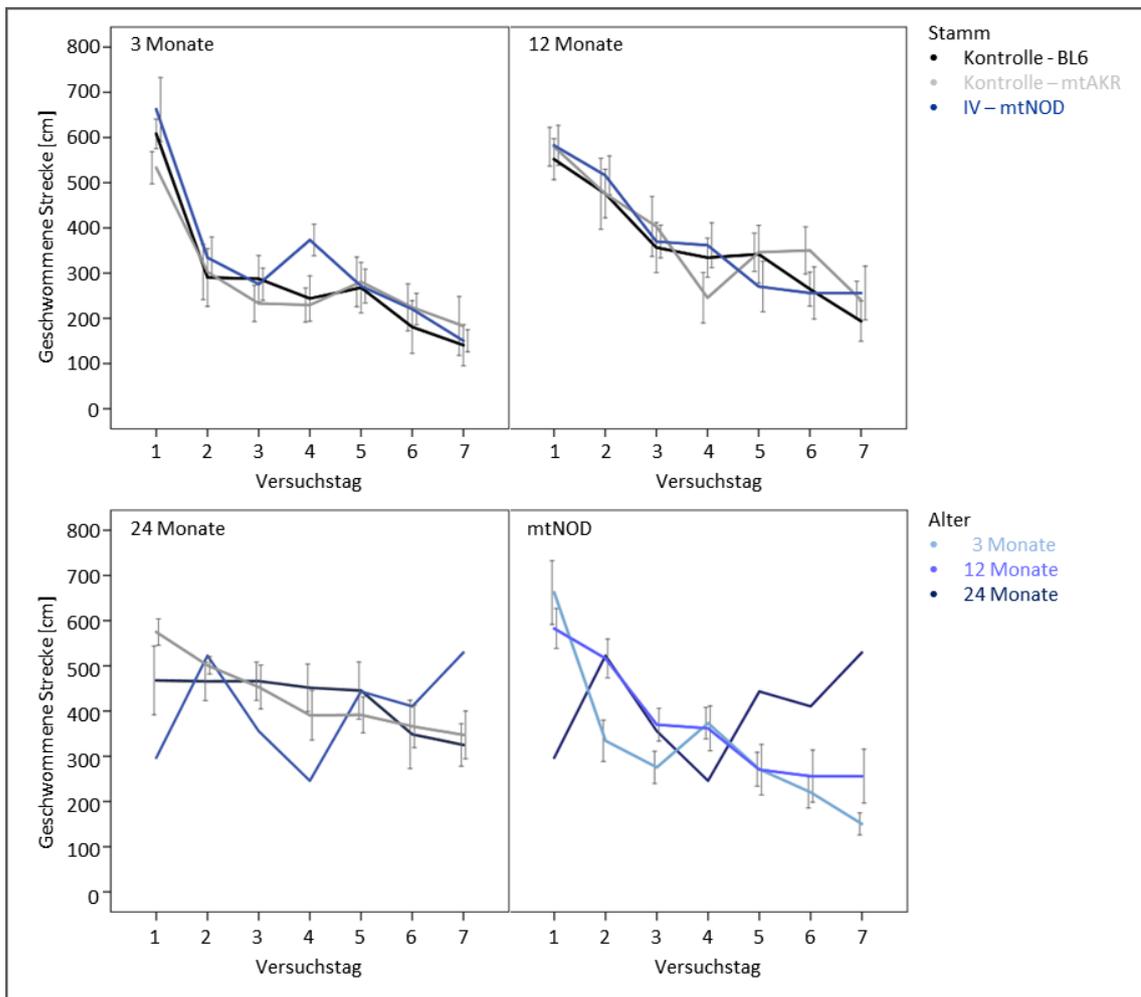


Abbildung R16: Ergebnisse des mtNOD-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.

Die obere Reihe und das Diagramm unten links zeigen die Lernverläufe innerhalb der Altersgruppen 3, 12 und 24 Monate im Vergleich zu den Kontrollen BL6 (schwarz) und mtAKR (grau), das Diagramm unten rechts zeigt die Lernverläufe innerhalb des mtNOD-Stammes in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die geschwommene Strecke in Form von Liniendiagrammen mit angegebenem Standardfehler über die Versuchstage eins bis sieben. n-Zahlen (3;12;24 Monate): mtNOD (10;10;1); BL6 (10;14;9); mtAKR (17; 9; 12); Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test (Tukey)

MtFVB (Mutation in Komplex V) zeigte beim Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im räumlichen Lernvermögen (Abbildung R17). Allerdings gab es innerhalb des Stammes altersabhängige Veränderungen. Die Gruppe der 3-Monate alten Tiere zeigte bereits an Versuchstag zwei einen starken Lernerfolg, der sich anschließend bis zum Ende des Versuches weiter leicht verbesserte. Bei den 12- und 24-Monate alten Tieren setzte dieser Lernerfolg deutlich langsamer ein und war somit im Vergleich zu den früh-adulten Tieren signifikant verschieden.

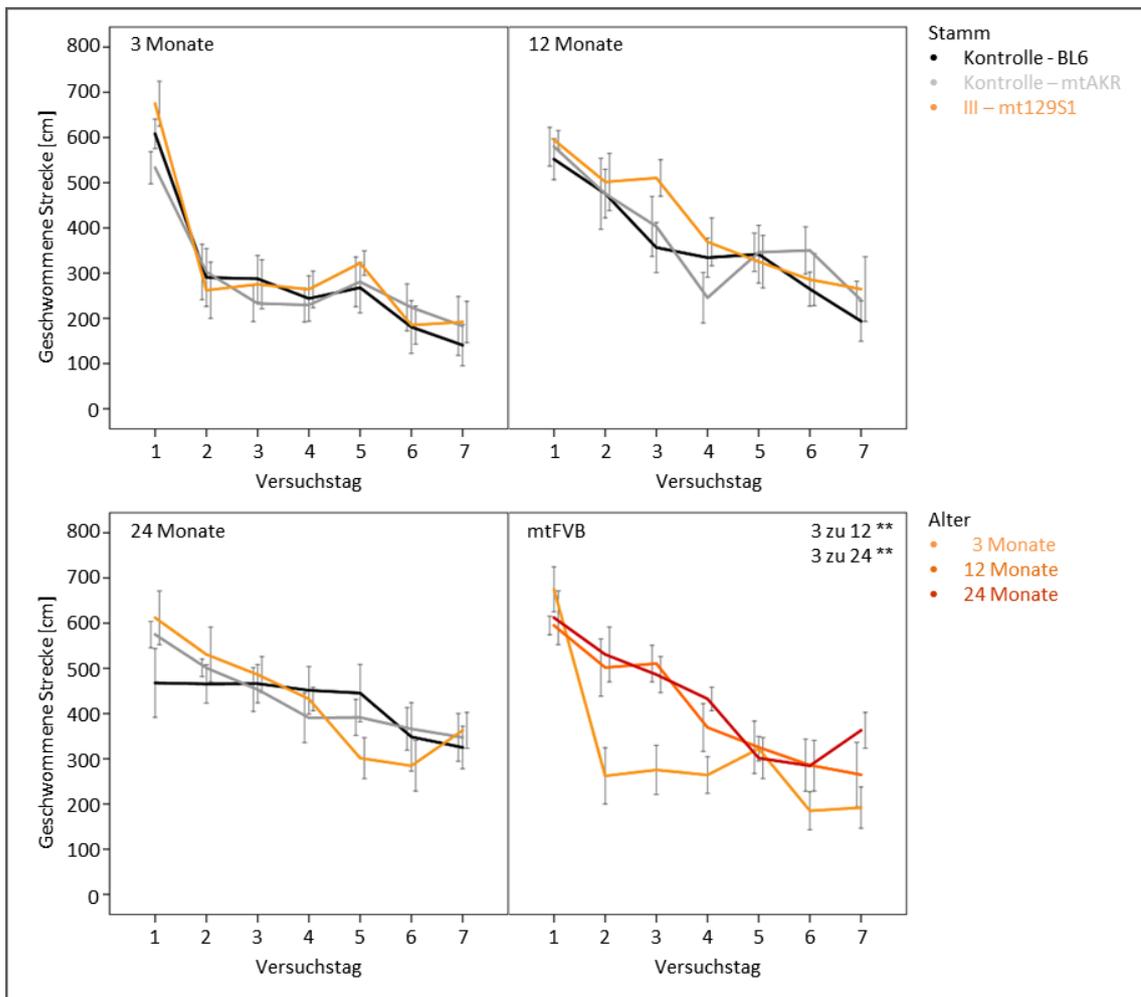


Abbildung R17: Ergebnisse des mtFVB-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.

Die obere Reihe und das Diagramm unten links zeigen die Lernverläufe innerhalb der Altersgruppen 3, 12 und 24 Monate im Vergleich zu den Kontrollen BL6 (schwarz) und mtAKR (grau), das Diagramm unten rechts zeigt die Lernverläufe innerhalb des mtFVB-Stammes in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die geschwommene Strecke in Form von Liniendiagrammen mit angegebenem Standardfehler über die Versuchstage eins bis sieben. n-Zahlen (3;12;24 Monate): mtFVB (9;8;10); BL6 (10;14;9); mtAKR (17; 9; 12); Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test (Tukey); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

In der Altersgruppe 24-Monate waren nicht immer alle Versuchstiere dazu in der Lage, den durch das Schwimmen mit körperlicher Anstrengung verbundenen Lernversuch komplett zu absolvieren. Dazu illustriert das Histogramm in Abbildung R18 den Anteil dieser Tiere an der gesamten Versuchsgruppe. Bei mtNOD war er besonders hoch, weil nur ein einziges Tier den kompletten Lernversuch absolvieren konnte. Dies stellt einen signifikanten Unterschied zu allen anderen Stämmen dar und könnte auf eine altersassoziierte Form der Belastungsintoleranz hindeuten.

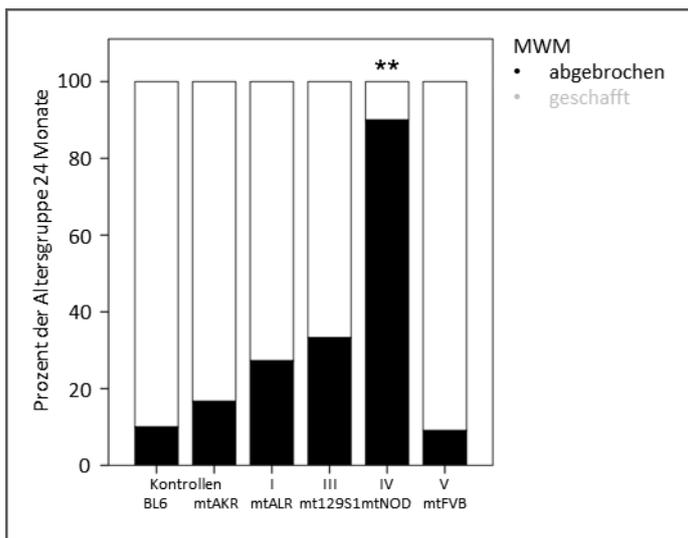


Abbildung R18: Vergleich des prozentualen Anteils an Tieren mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette, welche den MWM Lernversuch komplett absolvierten.

Das Histogramm zeigt den prozentualen Anteil an Tieren in der Altersgruppe 24 Monate, die den MWM Lernversuch komplett absolvieren konnten, beziehungsweise den Anteil der Tiere, bei denen aus körperlichen Gründen der Versuch vorzeitig abgebrochen werden musste. Exakter Test nach Fisher; ** signifikanter Unterschied mit $p \leq 0,01$ zu allen anderen Stämmen

3.3.3 Lernverlauf der UCP2-Knockout-Mutante

Die Lernverläufe der UCP2-Knockout-Mutante zeigten keine altersabhängige Veränderung (Abbildung R19). Im Vergleich zur BL6-Kontrolle wiesen die 3-Monate alten Tiere ein signifikant vermindertes Lernvermögen auf, die Lernkurve lag konstant über der der Kontrolle. Das besondere bei diesem Stamm war die schlechte körperliche Verfassung der Tiere im Alter von 24 Monaten, die dazu führte, dass mit Tieren dieser Altersgruppe keine Lernversuche im Watermaze durchgeführt werden konnten. Bei einem Tier der Altersgruppe 3-Monate musste der Lernversuch, ebenfalls auf Grund schlechter Konstitution, vorzeitig abgebrochen werden.

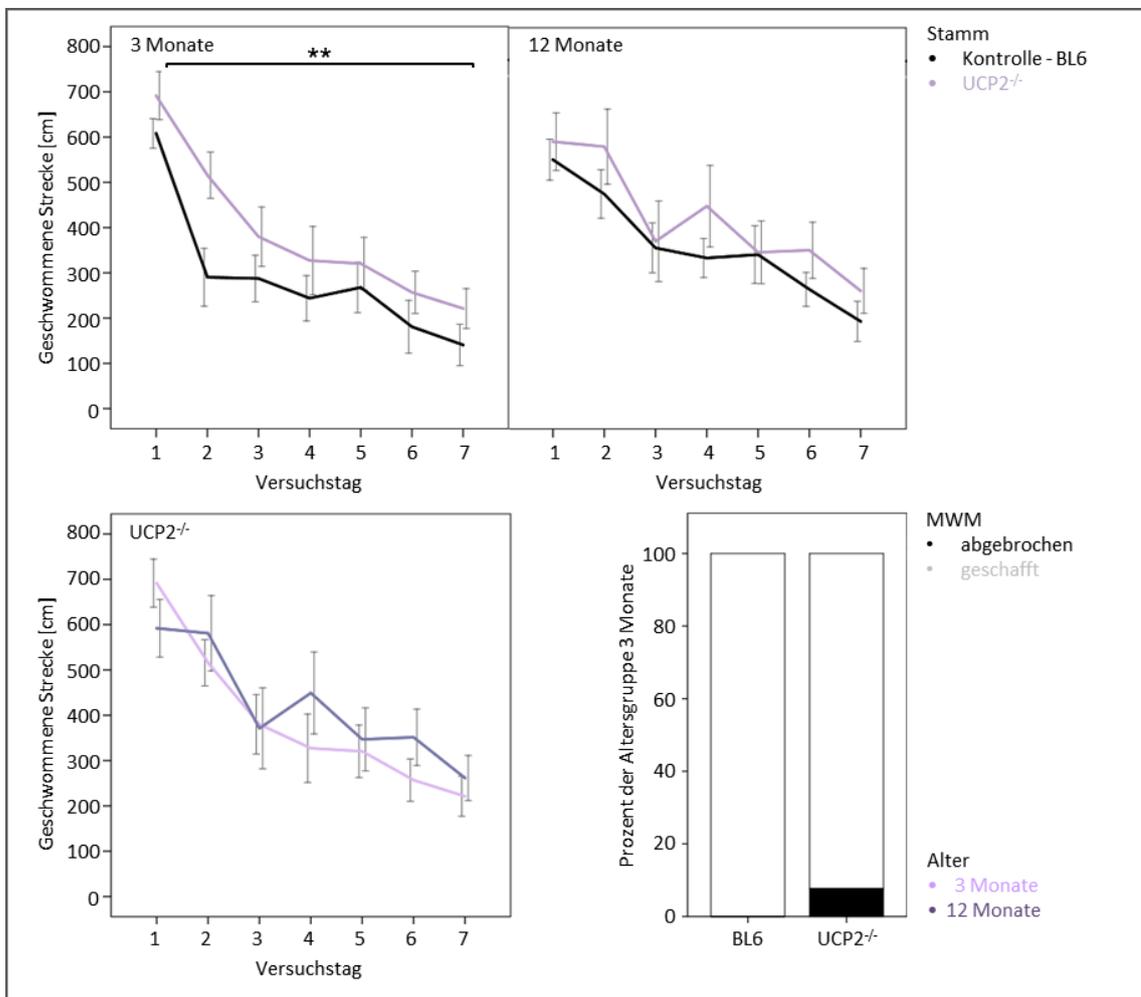


Abbildung R19: Ergebnisse der UCP2-Knockout-Mutante aus den Lernversuchen im MWM.

Die obere Reihe zeigt die Lernverläufe innerhalb der Altersgruppen 3 und 12 Monate im Vergleich zur Kontrolle BL6 (schwarz). Das Diagramm unten links zeigt die Lernverläufe innerhalb des UCP2^{-/-}-Stammes in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die geschwommene Strecke in Form von Liniendiagrammen mit angegebenem Standardfehler über die Versuchstage eins bis sieben. n-Zahlen (3;12;24 Monate): UCP2^{-/-} (12;10;0); BL6 (10;14;9); Varianzanalyse; ** p ≤ 0,01;

Das Histogramm unten rechts zeigt den prozentualen Anteil an Tieren in der Altersgruppe 3 Monate, die den MWM Lernversuch komplett absolvieren konnten, beziehungsweise den Anteil der Tiere, bei denen aus körperlichen Gründen der Versuch vorzeitig abgebrochen werden musste.

3.3.4 Lernverlauf der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA

Zwischen den Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA konnte nur in der Altersgruppe 24-Monate ein signifikanter Unterschied im räumlichen Lernvermögen festgestellt werden (Abbildung R20). Dieser bestand zwischen BL6 (8 A) und mtMRL (10-12 A). Während die Lernkurve der BL6-Mäuse auf einem mittleren Niveau startete und erst ab Tag sechs eine Verbesserung der Lernleistung zeigte, benötigten die mtMRL-Mäuse bis zum fünften Versuchstag deutlich mehr Schwimmstrecke zur Orientierung im Versuchsbecken. Allerdings konnten sie im weiteren Verlauf die BL6-Mäuse überholen und am letzten Versuchstag mit weniger Schwimmstrecke die Zielplattform erreichen (mtMRL: 256 cm \pm 44 cm; BL6: 325 cm \pm 47 cm). Im Altersvergleich zeigten die mtMRL-Mäuse einen signifikanten Unterschied im räumlichen Lernen zwischen allen untersuchten Altersgruppen, wobei eine umgekehrte Proportionalität zwischen Lernvermögen und Alter zu beobachten war.

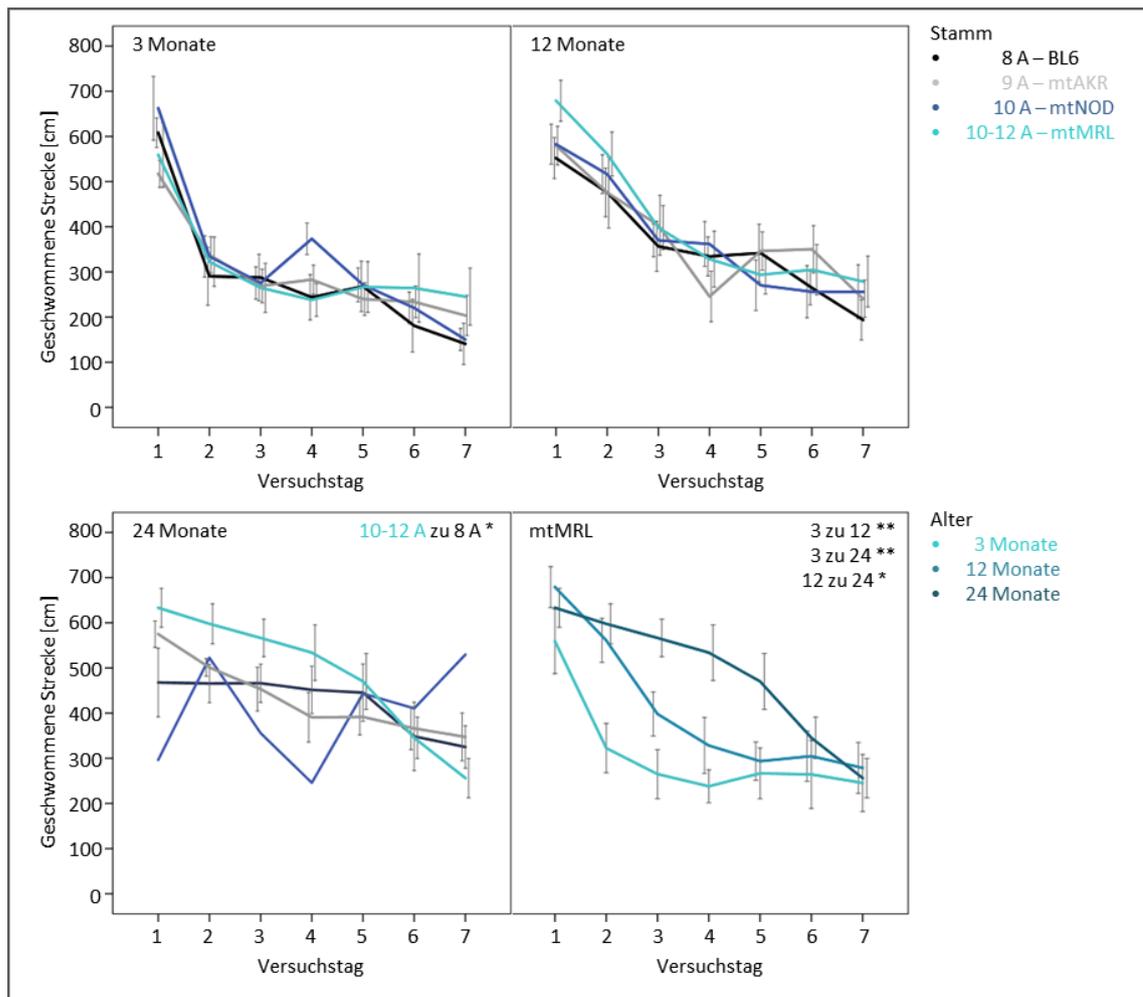


Abbildung R20: Ergebnisse der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA aus den Lernversuchen im MWM.

Die Diagramme der oberen Reihe und unten links zeigen die Lernverläufe der Stämme BL6 (schwarz), mtAKR (grau), mtNOD (blau) und mtMRL (türkis) innerhalb der Altersgruppen 3, 12 und 24 Monate. Das Diagramm unten rechts zeigt die Lernverläufe innerhalb des mtMRL-Stammes in den untersuchten Altersgruppen. Dargestellt ist die geschwommene Strecke in Form von Liniendiagrammen mit angegebenem Standardfehler über die Versuchstage eins bis sieben. n-Zahlen (3;12;24 Monate): BL6 (10;14;9); mtAKR (17; 9; 12); mtNOD (10;10;1); mtMRL (10;10;8); Varianzanalyse mit Post-Hoc-Test (Tukey); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Auch beim mtMRL-Stamm waren in der Altersgruppe 24-Monate nicht alle Versuchstiere körperlich dazu in der Lage, den Lernversuch komplett zu absolvieren. Dazu illustriert Abbildung R21 den Anteil dieser Tiere an der gesamten Versuchsgruppe. Dieser lag bei mtMRL auf vergleichbarem Niveau wie bei den Kontrollen. Somit fiel mtNOD (10 A), wo nur ein einziges Tier den kompletten Lernversuch absolvieren konnte, auch im Vergleich zu den Stämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA durch eine stark signifikant erhöhte Abbruchrate auf.

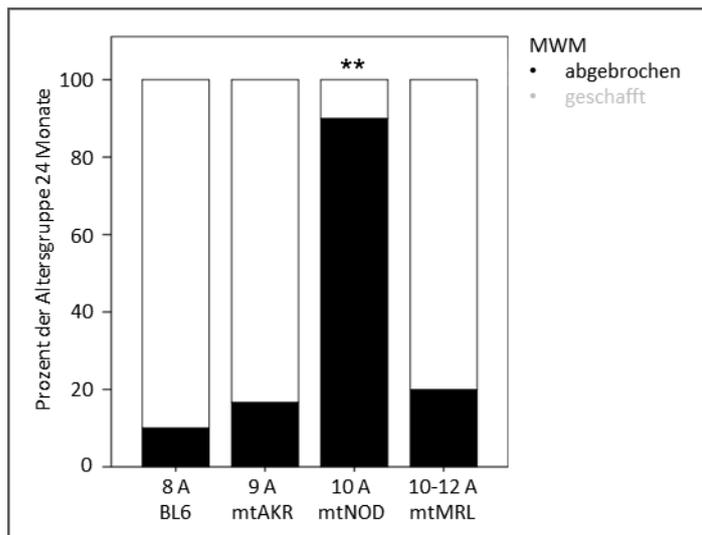


Abbildung R21: Vergleich der Tierzahlen mit absolviertem MWM Lernversuch der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.

Das Histogramm zeigt den prozentualen Anteil an Tieren in der Altersgruppe 24 Monate, die den MWM Lernversuch komplett absolvieren konnten, beziehungsweise den Anteil der Tiere, bei denen aus körperlichen Gründen der Versuch vorzeitig abgebrochen werden musste. Exakter Test nach Fisher; ** signifikanter Unterschied mit $p \leq 0,01$ zu allen anderen Stämmen

3.4 Erfassung der mittleren Lebensdauer

Zur Lebenszeitanalyse aller untersuchter Mausstämmen wurden die Tiere unter definierten Bedingungen bis zu ihrem natürlichen Lebensende gehalten. Die unterschiedlichen n-Zahlen ergaben sich durch die unterschiedliche Verfügbarkeit der Tiere (Ankauf *versus* zentrales Tierhaus *versus* Eigenzucht) und sind überdies der Grund, warum von einer geschlechtergetrennten Darstellung abgesehen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle R1 unter Angabe der jeweiligen Tierzahl zusammengefasst.

Tabelle R1: Mittlere Lebenszeiten der untersuchten Mausstämmen

	BL6	mtAKR	mtALR	mt129S1	mtNOD	mtFVB	UCP2 ^{-/-}	mtMRL
Median [d]	802	801	803	836	783	843	681	829
n - Zahl	61	70	30	43	42	42	44	68
Konfidenzintervall (95%) [d]	780 - 824	745 - 857	788 - 818	768 - 905	744 - 822	764 - 922	632 - 730	787 - 871
1000 d	11,5 %	7,1 %	3,3 %	9,3 %	0 %	11,9 %	0 %	11,8 %
Ältestes Tier [d]	1192	1060	1003	1021	987	1049	906	1109

3.4.1 Lebensdauer der Kontrollstämme

Die verwendeten Kontrollstämme BL6 und mtAKR zeigten bei der Analyse ihrer Lebenszeitspanne keine signifikanten Unterschiede (Abbildung R22). Die mittlere Überlebenszeit lag mit nur einem Tag Unterschied sehr dicht bei einander. Allerdings fiel beim Vergleich der Überlebenskurven auf, dass beim mtAKR-Stamm (Tag 165) die ersten Tiere sehr viel früher verstarben als bei BL6 (Tag 428).

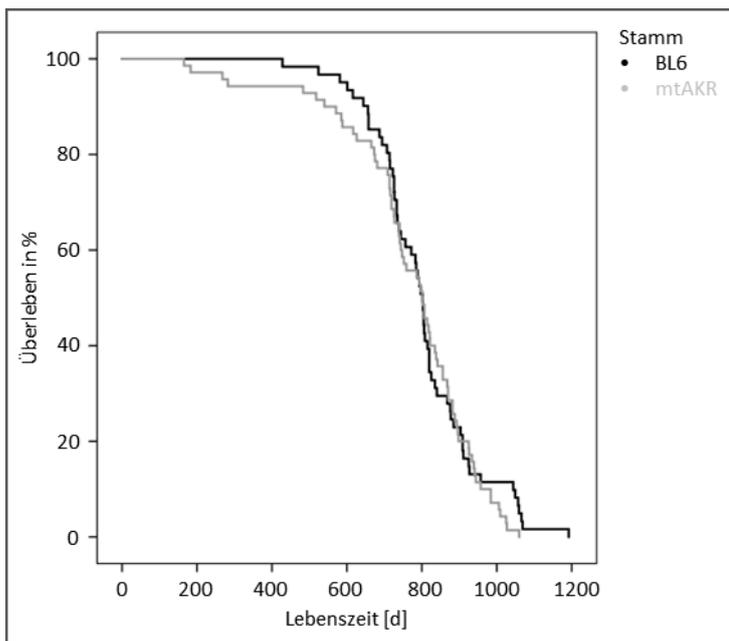


Abbildung R22: Überlebensanalyse der Kontrollstämme.

Analyse der Überlebenszeiten der Kontrollstämme BL6 (schwarz) und mtAKR (grau). n-Zahlen (n): BL6 (61); mtAKR (70); Log-Rang-Test (Mantel-Cox)

Im mittleren Bereich, etwa ab Tag 700, waren beide Kurven nahezu deckungsgleich und trennten sich erst im hohen Alter, etwa ab Tag 950, wieder, wobei auch hier der BL6-Stamm (11,5 % der Tiere lebten 1000 und mehr Tage) mit einer größeren Anzahl sehr alter Tiere besser abschnitt als mtAKR (7,1 % der Tiere lebten 1000 und mehr Tage). Das Tier, welches von allen Versuchstieren mit Abstand am längsten lebte, war mit 1192 Tagen ein BL6-Männchen.

3.4.2 Lebensdauer der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette

Der Vergleich der Überlebenszeiten der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette ergab eine signifikant längere Lebenszeit des mtFVB-Stammes (Mutation in Komplex V) gegenüber der mtAKR-Kontrolle (Abbildung R23). Die Überlebenskurve von mtAKR lag über den gesamten Untersuchungszeitraum (mit Ausnahme der am längsten lebenden Tiere) deutlich unter der von mtFVB.

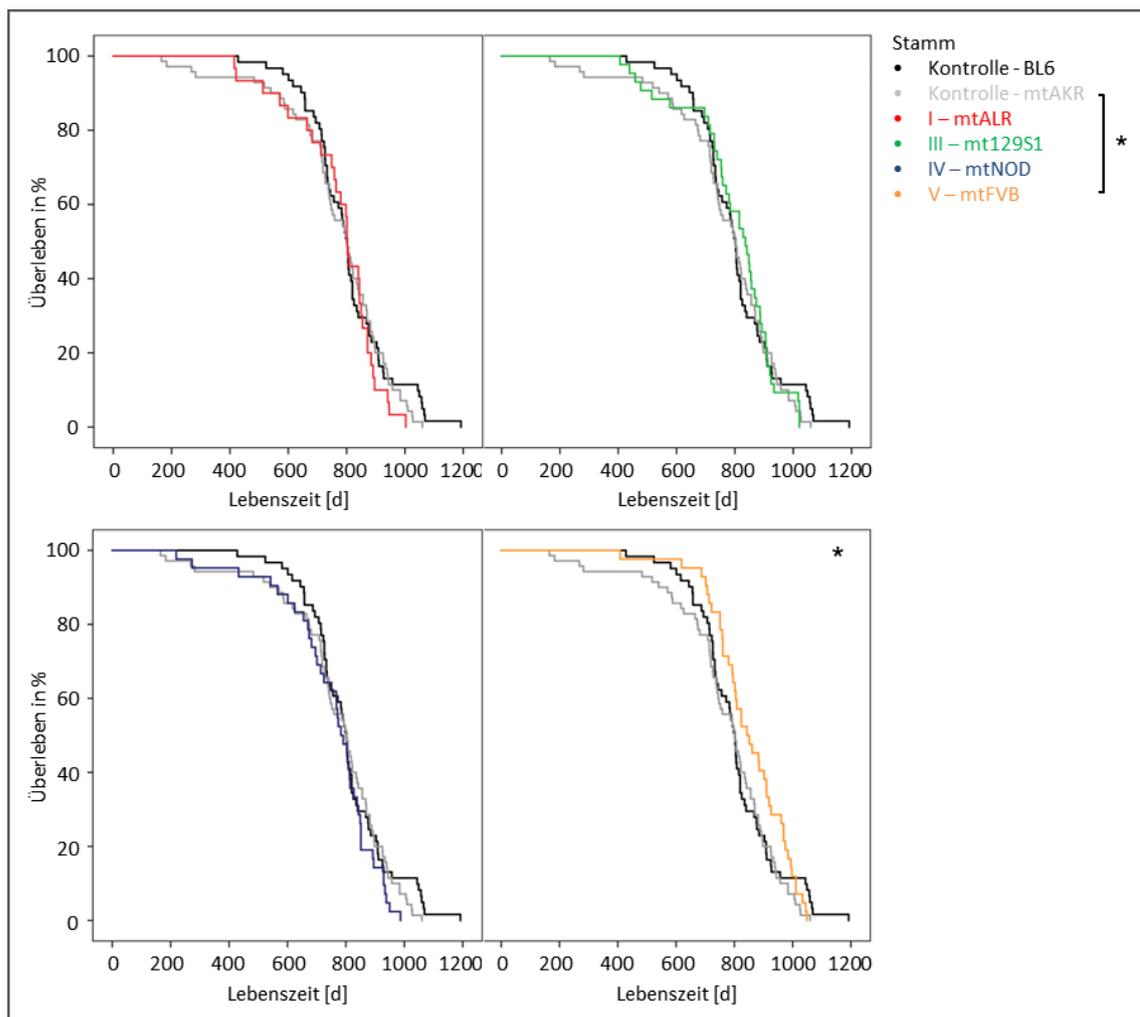


Abbildung R23: Überlebensanalyse der Mausstämmen mtALR, mt129S1, mtNOD und mtFVB.

Analyse der Überlebenszeiten von mtALR (oben links), mt129S1 (oben rechts), mtNOD (unten links) und mtFVB (unten rechts) im Vergleich zu den Kontrollstämmen BL6 (schwarz) und mtAKR (grau). n-Zahlen (n): mtALR (30); mt129S1 (43); mtNOD (42); mtFVB (42); BL6 (61); mtAKR (70); Log-Rang-Test (Mantel-Cox); * $p \leq 0,05$

Auch im Vergleich der conplastischen Stämme untereinander fiel mtFVB durch eine zu mtNOD (Komplex IV) und mtALR (Komplex I) signifikant längere Lebenszeit auf (Abbildung R24). Zudem gab es bei den mtFVB-Tieren, wie aus Tabelle R1 ersichtlich, mit 11,9 % den größten Anteil an Tieren, die 1000 Tage und älter wurden.

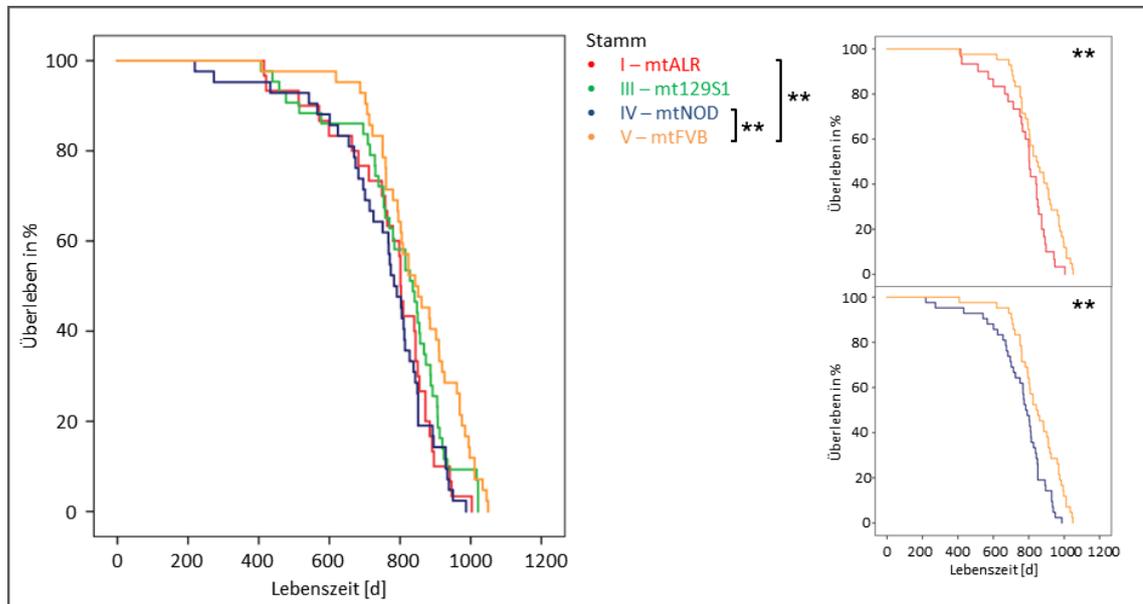


Abbildung R24: Überlebensanalyse der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.

Vergleichende Analyse der Überlebenszeiten von mtALR (rot), mt129S1 (grün), mtNOD (blau) und mtFVB (orange). Die kleinen Diagramme rechts heben die im Vergleich zu mtFVB kürzeren Lebenszeiten von mtALR (oben) und mtNOD (unten) hervor. n-Zahlen (n): mtALR (30); mt129S1 (43); mtNOD (42); mtFVB (42); Log-Rang-Test (Mantel-Cox); ** $p \leq 0,01$

Die Überlebenskurve von mtNOD lag ab dem ersten verstorbenen Tier nach 219 Tagen konstant unter der von mtFVB. Keines der mtNOD-Tiere erreichte eine Lebenszeit von 1000 Tagen. Die Überlebenskurve von mtALR lag sowohl im Anfangs- als auch im Endbereich unter der von mtFVB, im mittleren Lebensalter um den Tag 800 näherten sich die Kurven beider Stämme an. Der Anteil an Tieren, die 1000 Tage und älter wurden, war mit 3,3 % bei mtALR gering.

3.4.3 Lebensdauer der UCP2-Knockout-Mutante

Wie aus Abbildung R25 ersichtlich, wies die UCP2-Knockout-Mutante (Median 681 Tage) im Vergleich zur BL6-Kontrolle (Median 802 Tage) eine deutlich verringerte Lebenszeit auf. Das erste Tier verstarb nach 208 Tagen und die Überlebenskurve lag über den gesamten Untersuchungszeitraum unter der von BL6. Keines der UCP2^{-/-}-Tiere erreichte ein Alter von 1000 Tagen und das Alter des ältesten Tieres im Experiment unterschied sich im Vergleich zur Kontrolle um 286 Tage (UCP2^{-/-}: 906 Tage; BL6: 1192 Tage).

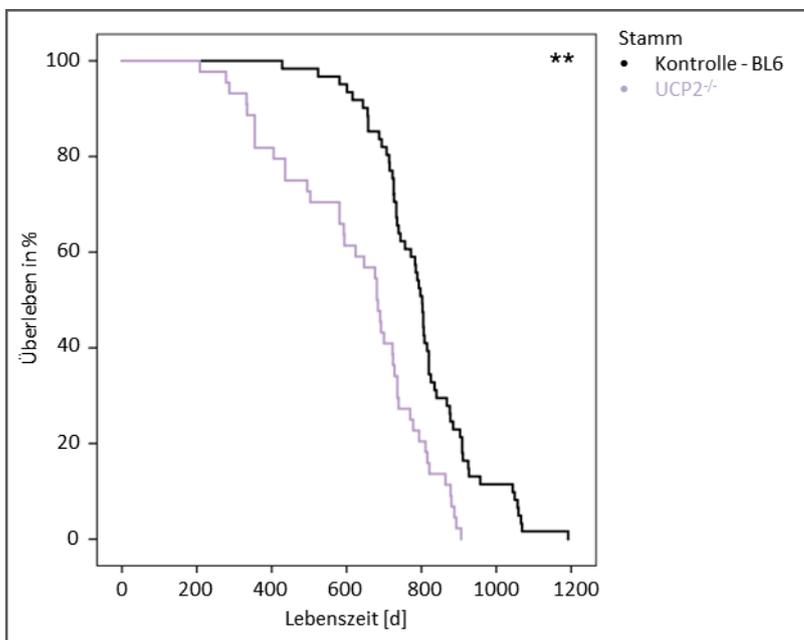


Abbildung R25: Überlebensanalyse der UCP2-Knockout-Mutante.

Analyse der Überlebenszeiten von UCP2^{-/-} (lila) im Vergleich zur BL6-Kontrolle (schwarz). n-Zahlen (n): UCP2^{-/-} (44); BL6 (61); Log-Rang-Test (Mantel-Cox); ** p ≤ 0,01

3.4.4 Lebensdauer der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA

Bei der Analyse der Lebenszeiten der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA gab es keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollstämmen BL6 und mtAKR (Abbildung R26). MtMRL (10-12 A) zeigte zwar tendenziell eine Verlängerung der Lebenszeit, vor allem im Vergleich zu mtAKR, diese erreichte allerdings nicht das geforderte Signifikanzniveau ($p = 0,058$ zu mtAKR).

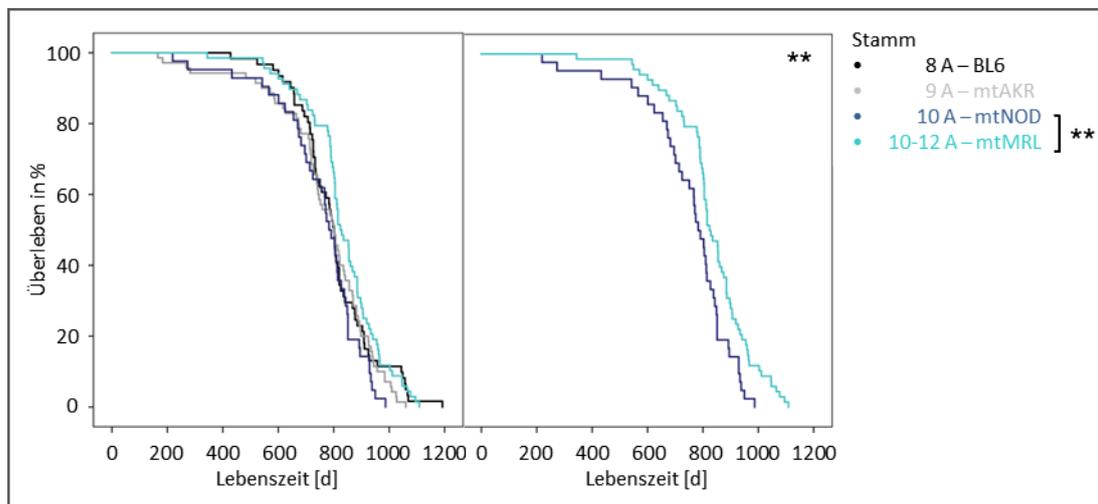


Abbildung R26: Überlebensanalyse der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.

Analyse der Überlebenszeiten von mtNOD (blau) und mtMRL (türkis) im Vergleich mit den Kontrollen BL6 (schwarz) und mtAKR (grau). Das Diagramm rechts hebt die im Vergleich zu mtMRL kürzere Lebenszeit von mtNOD hervor. n-Zahlen (n): mtNOD (42); mtMRL (68); BL6 (61); mtAKR (70); Log-Rang-Test (Mantel-Cox); ** $p \leq 0,01$

Im direkten Vergleich der Lebenszeiten von mtMRL und mtNOD (10 A) ergab sich ein deutlicher signifikanter Unterschied ($p = 0,004$). Wie in Abbildung R26 ersichtlich, lag die Überlebenskurve von mtNOD konstant unter der von mtMRL. Während bei mtNOD kein Tier ein Alter von 1000 Tagen und mehr erreichte, schafften dies bei mtMRL acht Tiere (11,8 %). Das älteste Tier des mtMRL-Stammes wurde mit 1109 Tagen ganze 122 Tage älter als das des mtNOD-Stammes.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die nachfolgenden zwei Tabellen fassen zur Übersicht die beschriebenen Ergebnisse in Kurzform zusammen. Dabei sind, außer für die Lebenszeitdaten und die Konstitution im Alter von 24 Monaten, jeweils zwei Informationen pro Stamm angegeben:

Zum Einen ist eine mögliche Veränderung innerhalb eines Stammes im Alterungsverlauf als richtungsweisendes Pfeildiagramm dargestellt. Zum Anderen sind die Ergebnisse der Mutanten-Stämme mit denen der jeweiligen Kontrolle (mtAKR; bei UCP2^{-/-} BL6) verglichen worden. Hierbei ist ein möglicher Unterschied mit + oder – gekennzeichnet (siehe Legende unter Tabelle R3).

Tabelle R2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette und der UCP2-Knockout-Mutante

	mtAKR	mtALR	mt129S1	mtNOD	mtFVB	BL6	UCP2 ^{-/-}
SNP	-	Komplex	Komplex	Komplex	Komplex	-	UCP2 ko
Atmungskette		I	III	IV	V		
A an mt nt9821	9	9	9	10	9	8	8
Lebenszeit							
Median [d]	801	803	836	783	843 +	802	681 --
Konstitution 24 Monate	≈	≈	(-)	--	≈	≈	--
Lernvermögen							
MWM							
GFAP/NeuN							
Hippocampus							
ROS							
H							
C							

Tabelle R3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA

	BL6	mtAKR	mtNOD	mtMRL
A an mt nt9821	8	9	10	10-12
SNP	-	-	Komplex IV	-
Atmungskette				
Lebenszeit				
Median [d]	802	801	783	829
Konstitution 24 Monate	≈	≈	--	≈
Lernvermögen				
MWM				
GFAP/NeuN				
Hippocampus				
ROS				
H				
C				

Legende:

Altersgruppen

Zunahme +

Abnahme -

keine Veränderung

+/- signifikanter Unterschied mit $p \leq 0,05$ zur Kontrolle gleichen Alters

++/-- signifikanter Unterschied mit $p \leq 0,01$ zur Kontrolle gleichen Alters

statistisch signifikant

Tendenz ohne statistische Signifikanz

Die in der vorgelegten Arbeit verwendeten Daten wurden bisher wie folgt publiziert:

Publikationen in Peer-Review-Journalen:

Mayer J*, **Reichart G***, Tokay T*, Lange F, Baltrusch S, Junghanss C, Wolkenhauer O, Jaster R, Kunz M, Tiedge M, Ibrahim SM, Fuellen G, Köhling R (2015) Reduced adolescent-age spatial learning ability associated with elevated juvenile-age superoxide levels in complex I mouse mutants. *PLoS One*, 10(4), e0123863, PMID: 25853418

Hirose M, Schilf P, Lange F, Mayer J, **Reichart G**, Maity P, Jöhren O, Schwaninger M, Scharffetter-Kochanek K, Sina C, Sadik CD, Köhling R, Miroux B, Ibrahim SM (2016) Uncoupling protein 2 protects mice from aging. *Mitochondrion*, 30, 42-50, PMID: 27364833

Reichart G*, Mayer J*, Zehm C, Kirschstein T, Tokay T, Lange F, Baltrusch S, Tiedge M, Fuellen G, Ibrahim S, Köhling R (2018) Mitochondrial complex IV mutation increases ROS production and reduces lifespan in aged mice. *Acta Physiologica*, 225(4), e13214, PMID: 30376218

* gleichberechtigte Autorenschaft

Posterpräsentation auf der jeweiligen Haupttagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG):

Reichart G, Tokay T, Mayer J, Ibrahim S, Baltrusch S, Köhling R. (2012) Differential influence of respiratory chain dysfunction on cognitive functions during development. *Acta Physiologica*, Vol 204, Suppl 689: P302.

Reichart G, Mayer J, Tokay T, Ibrahim S, Baltrusch S, Köhling R. (2013) ROS production and long-term potentiation in young adult of conplastic mouse models with mutations in mitochondrial DNA. *Acta Physiologica*, Vol 207, Suppl 694: P068 ◊

Mayer J, **Reichart G**, Tokay T, Ibrahim S, Baltrusch S, Köhling R. (2014) Age-related changes in the mouse brain hippocampus. *Acta Physiologica*, Vol 210, Suppl 695: P320.

Reichart G, Mayer J, Zehm C, Tokay T, Lange F, Baltrusch S, Ibrahim S, Köhling R. (2019) Mitochondrial complex IV mutation increases ROS production and reduces lifespan in aged mice.

◇ Das Poster mit dem Titel: „ROS production and cognitive functions in conplastic mouse models with mutations in mitochondrial DNA“ gewann 2013 einen Posterpreis.

4 Diskussion

Defekte der mitochondrialen DNA, die große Bereiche betreffen, wurden vielfach mit negativen Auswirkungen auf die Lebensdauer und Gewebeintegrität der betroffenen Organismen beschrieben (Wallace *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1988; Cortopassi *et al.*, 1992; Gorman *et al.*, 2015). Der vorliegenden Arbeit lag die Frage zu Grunde, ob bereits spezifische Punktmutationen in der mtDNA Parameter wie Lebensdauer und Lernvermögen beeinflussen. Von besonderem Interesse waren dabei Punktmutationen in Genen der mitochondrialen Atmungskette, da hier auftretende Veränderungen leicht mitochondriale Dysfunktion zur Folge haben können (Torraco *et al.*, 2015). Überdies erscheinen Veränderungen in Genen der mitochondrialen tRNAs für die Ausbildung von Dysfunktionen besonders bedeutsam, da tRNA Mutationen für etwa die Hälfte aller Erkrankungen, die auf eine Mutation im mitochondrialen Genom zurückgehen, verantwortlich sind. Dies ist insofern erstaunlich, weil tRNA-Gene nur circa zehn Prozent der mitochondrialen DNA ausmachen (Moreno-Loshuertos *et al.*, 2011; Schon *et al.*, 2012).

Bekannte Mausmodelle zur Untersuchung von mitochondrialer Dysfunktion fokussieren üblicherweise auf zwei grundlegende Ansätze: Die meisten beschriebenen Modelle sind Knockouts oder Knockins von kernkodierten Genen der Atmungskettenkomplexe oder essentieller strukturgebender Faktoren (Torraco *et al.*, 2015). Der zweite, oft genutzte Ansatz besteht darin, die Entstehung von zufälligen Mutationen in der mtDNA zu forcieren, welche zum Beispiel durch eine defekte Korrekturlesefunktion der mitochondrialen DNA-Polymerase *Poly* bei der sogenannten *Mutator-Maus* erzielt werden (Trifunovic *et al.*, 2004; Kujoth *et al.*, 2005). Der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz ging dagegen von conplastischen Mäusen mit definierten Punktmutationen in der mitochondrialen DNA (mit Ausnahme von *UCP2^{-/-}*) aus, um diesen mögliche Phänotypen konkret zuordnen zu können. Dabei entsprechen die verwendeten conplastischen Mausstämme eher einer Krankheitssimulation durch erbliche Mutation (eine Mutation in hoher Kopienzahl) als einer Alterssimulation mit vielen verschiedenen Mutationen in jeweils geringer Anzahl pro Zelle (Dufor *et al.*, 2004). Dadurch war, mit Ausnahme der heteroplasmischen tRNA-Mutationen, gewährleistet, dass ein möglicher Phänotyp direkt mit der betreffenden Mutation korreliert werden kann.

Damit eine mitochondriale Dysfunktion entsteht, ist es nach Larsson (Larsson 2010) erforderlich, dass sie einen entsprechenden Anteil an allen mtDNA-Kopien der Zelle ausmacht, welcher je nach betroffenem Gen bei mindestens 60 Prozent liegt. Daher sind wahrscheinlich eher vererbte Mutationen oder solche, die in jungen Jahren entstehen und sich durch klonale Expansion vermehren, dazu in der Lage, einen bestimmten Phänotyp hervorzurufen (Kauppila *et al.*, 2015).

4.1 Der Einfluss von einzelnen Punktmutationen in Genen der mitochondrialen Atmungskette

MtALR – Die Punktmutation im Atmungskettenkomplex I beeinträchtigt vor allem die spät-adulte Lebensphase.

Komplex I ist das größte Enzym der mitochondrialen Atmungskette und besteht aus mindestens 44 Untereinheiten, wovon sieben mitochondrial kodiert sind (Brandt, 2006). Etwa die Hälfte aller bekannten Krankheiten, die den mitochondrialen Energiemetabolismus betreffen, sind auf Mutationen im Komplex I zurückzuführen (Smeitink *et al.*, 2001). Gleichzeitig gilt Komplex I quasi als Hauptentstehungsort für mitochondriales Superoxid innerhalb der Atmungskette (Wirth *et al.*, 2016). Daher erschien der mtALR Stamm zu Beginn der Untersuchungen als besonders interessant. Aus der Literatur bekannte Mausmodelle mit beeinträchtigter Komplex-I-Aktivität zeigen zumeist drastische Phänotypen mit deutlich reduzierter Lebenserwartung: So führt zum Beispiel das Ausschalten der Komplex-I-Untereinheit NDUFS4, welche essentiell für die Assemblierung und Stabilität von Komplex I ist (Antonicka *et al.*, 2003a; Lazarou *et al.*, 2007), zu einem dem Leigh Syndrom ähnlichen Phänotyp mit Ataxie, Blindheit, verzögertem Wachstum und verfrühtem Tod der Mäuse im Alter von sieben Wochen (Kruse *et al.*, 2008). Der generelle Knockout der Untereinheit NDUF5A ist in Mäusen sogar embryonal lethal. Ein postnataler Knockout, der zellspezifisch nur Neurone betrifft, führt zu einem milden Phänotyp mit altersassoziiertem Verlust der motorischen Fähigkeiten ab einem Alter von elf Monaten (Peralta *et al.*, 2013). NDUF6 ist eine konservierte Untereinheit von Komplex I und Teil des enzymatischen Kerns (Fearnley *et al.*, 1992; Hirst *et al.*, 2003). *Ndufs6*-Knockout-Mäuse zeigen eine starke Cardiomyopathie und versterben früh nach etwa vier bis fünf Monaten (Ke *et al.*,

2012). Eine heteroplasmische Mutation in der mitochondrial kodierten Komplex-I-Untereinheit ND6 führt bei den entsprechenden Mäusen zu altersassoziiertem Verlust von Axonen des Sehnervs mit abnormaler Mitochondrienmorphologie, verminderter Komplex-I-Aktivität und hohem ROS Gehalt (Lin *et al.*, 2012).

Beim mtALR-Mutantenstamm dagegen konnte in keiner der untersuchten Altersgruppen ein signifikanter Unterschied zur mtAKR-Kontrolle im Gehalt an mitochondrialem Superoxid festgestellt werden. Da allerdings gerade bei der früh-adulten Gruppe eine recht große Streuung auftrat, könnte eine Erhöhung der Stichprobenanzahl in dieser Altersgruppe einen möglicherweise vorhanden Unterschied sichtbar machen. Der signifikante Unterschied zum BL6-Stamm legt dies nahe. Tatsächlich unterschied sich der mtALR-Stamm in Bezug auf mitochondriales ROS vom mtAKR-Kontrollstamm dahingehend, dass bei der Komplex-I-Mutante der Superoxidgehalt über alle untersuchten Altersgruppen auf einem konstant hohen Niveau verblieb, wohingegen die Kontrolle einen altersabhängigen Anstieg aufwies. Insofern scheint die Mutation des mtALR-Stammes die ROS-Produktion durchaus zu beeinflussen. In einer Partnerarbeitsgruppe des Verbundprojektes ROSAge wurde bei Fibroblasten von mtALR-Tieren eine erhöhte Aktivität des Atmungskettenkomplexes I gemessen (Schauer *et al.*, 2015). Dies könnte den tendenziell höheren Superoxidgehalt in früh-adulten Tieren erklären. Im Sinne der *Mitohormesis-Hypothese* wäre zu erwarten, dass dadurch Gegenmechanismen, wie zum Beispiel eine verstärkte Expression antioxidativer Enzyme (Sena *et al.*, 2012; Ristow, 2014; Yun *et al.*, 2014), in Gang gesetzt werden. Diese Hypothese passt zu dem Ergebnis der gleichbleibenden Superoxid-Spiegel über alle Altersgruppen, da durch einen höheren Gehalt an ROS-abbauenden Enzymen der normalerweise altersassoziierte Anstieg von ROS (Bokov *et al.*, 2004) unterdrückt werden könnte. Zur Klärung dieser Hypothese wäre in weiterführenden Arbeiten eine Analyse der Expression antioxidativer Enzyme nötig. Ein weiterer interessanter Aspekt des mtALR-Stammes ist der signifikant geringere GFAP-Gehalt im Hippocampus während der spät-adulten Lebensphase. Auch der GFAP-Gehalt bleibt bei den mtALR-Mäusen, ebenso wie der Gehalt an mitochondrialem Superoxid, über alle untersuchten Altersgruppen konstant. GFAP ist Hauptbestandteil der Intermediärfilamente von Gliazellen und kommt im Zentralnervensystem überwiegend in Astrocyten vor. Zusätzlich zu seiner Beteiligung am Cytoskelett ist es von besonderer Bedeutung bei der Aktivierung von Astrocyten (Zhang *et al.*, 2017). Diese und die damit verbundene Steigerung der GFAP-Expression

spielen eine wichtige Rolle beim Erhalt der Integrität des Gehirns in der akuten Phase von traumatischen Ereignissen und bei oxidativem Stress (Pekny *et al.*, 2014; Daverey *et al.*, 2016). Daher könnte der verminderte Gehalt an GFAP im Alter von 12 Monaten eine direkte Folge dessen sein, dass es bei mtALR zu keiner Veränderung des ROS-Gehaltes von der früh- zur spät-adulten Lebensphase kommt. Dies spräche für eine Signalfunktion von ROS bei der Aktivierung von Astrocyten.

Wie die Arbeitsgruppe um Milos Pekny zeigen konnte, spielen die Intermediärfilamente in Astrocyten, dabei vor allem GFAP und Vimentin, eine wichtige Rolle im Antwortverhalten auf oxidativen Stress (de Pablo *et al.*, 2013). Die Arbeitsgruppe postulierte, dass GFAP essentiell für die Eliminierung von ROS ist und schlug als einen möglichen Mechanismus eine Sensorfunktion von GFAP für ROS vor. In Versuchen mit neuronalen Zellkulturen konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Sauerstoffentzug das GFAP-Signal in Astrocyten abnimmt. Ist Sauerstoff anschließend wieder verfügbar, kommt es zunächst zu einem erhöhten Gehalt an Sauerstoffradikalen und gleichzeitig steigt auch das GFAP-Signal wieder an. Da der Gehalt an mitochondrialem Superoxid bei mtALR-Tieren keinen altersabhängigen Anstieg zeigt, kommt es folglich auch zu keinem GFAP-Anstieg.

Überdies korreliert der verminderte GFAP-Gehalt im Hippocampus mit einer signifikant schlechteren Lernleistung im Water Maze im Alter von 12 Monaten. Dieses Ergebnis ließe sich, wenn der verminderte GFAP-Gehalt im Sinne einer reduzierten Astrocytenzahl oder -aktivität gedeutet wird, über die Vielzahl der wichtigen Astrocytenfunktionen erklären, welche nachgewiesenermaßen für das Lernen von entscheidender Bedeutung sind. Eine dieser Funktionen ist das Astrocyten-Neuronen-Lactat-Shuttling, wobei Astrocyten Glucose zu Lactat verstoffwechseln und dieses anschließend den Neuronen zur Energiegewinnung zur Verfügung stellen (Bélanger *et al.*, 2011). In Verhaltensversuchen mit Ratten konnte gezeigt werden, dass dieser Lactat-Transport essentiell für ein funktionierendes Langzeitgedächtnis ist (Suzuki *et al.*, 2011). Überdies spielen Interaktionen zwischen Neuronen und Astrocyten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Plastizität von Synapsen (Allen *et al.*, 2005), welche ihrerseits als zentrale zelluläre Grundlage von Lernprozessen angesehen wird (Bliss *et al.*, 1993). Astrocyten setzen dabei Substanzen frei, wie zum Beispiel Thrombospondin, welches die Synaptogenese steuert, oder den Neurotransmitter D-Serin, welcher die synaptische Transmission reguliert (Halassa *et al.*, 2007). An excitatorischen Synapsen können Astrocyten synaptische Aktivität erkennen und

reagieren darauf mit der Freisetzung von Gliotransmittern, welche die Aktivität des entsprechenden Neurons modulieren (Halassa *et al.*, 2007). Überdies konnte gezeigt werden, dass die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt durch Astrocyten kritisch für den Ablauf hippocampaler Lernvorgänge ist (Filosa *et al.*, 2009). Folglich könnte die verminderte Astrocytenaktivität der 12 Monate alten mtALR-Tiere den Lernerfolg negativ beeinflusst haben.

Mechanismen der Mitohormesis haben vielfach einen positiven Einfluss auf die Lebensdauer der entsprechenden Organismen (Holzenberger *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2004; Quarrie *et al.*, 2004; Kappeler *et al.*, 2008). Dieser konnte für den mtALR-Stamm nicht beobachtet werden, die in der Arbeit festgestellte mittlere Lebensdauer war lediglich um zwei Tage länger als die des Kontrollstammes.

Mt129S1 – Die Veränderung im Atmungskettenkomplex III beeinträchtigt das Lernvermögen in der früh-adulter und die Konstitution in der senilen Lebensphase.

Atmungskettenkomplex III besteht aus drei katalytischen und acht strukturellen Untereinheiten, wovon eine der katalytischen, Cytochrom b, mitochondrial kodiert ist (Toracco *et al.*, 2015). Isolierte Komplex-III-Defizienz ist beim Menschen vergleichsweise selten, wird aber mit einer großen Bandbreite an Symptomen wie Cardiomyopathie, Belastungsintoleranz, neurologischen Abnormalitäten und psychomotorischer Retardierung in Zusammenhang gebracht (Keightley *et al.*, 2000; Haut *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2011). Interessanterweise liegen Komplex-III-Mutationen, die beim Menschen einen pathogenen Phänotyp hervorrufen, nahezu ausschließlich in der mitochondrial kodierten Untereinheit (Barel *et al.*, 2008), welche auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten mt129S1-Stamm eine Punktmutation trägt. Mausmodellen mit Komplex-III-Defizienz ist in der Regel eine deutlich reduzierte Lebensdauer gemeinsam (Leveen *et al.*, 2011; Hughes *et al.*, 2011; Diaz *et al.*, 2012). Besonders interessant unter dem Aspekt von Veränderungen im Gehirn sind die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe die mit *risp*-Knockout Mäusen gearbeitet hat. RISP ist eine der kernkodierten katalytischen Untereinheiten von Komplex III und der neuronenspezifische Knockout führte bei den Versuchsmäusen zu einer stark verkürzten Lebensdauer von durchschnittlich nur drei Monaten. Histologische Untersuchungen ergaben erhöhten oxidativen Stress mit vermehrtem Absterben von Neuronen

vornehmlich im Bereich des Piriformen Cortex und des Hippocampus (Diaz *et al.*, 2012).

Beim mt129S1-Stamm konnten keine erhöhten ROS-Gehalte festgestellt werden. Auffällig gegenüber der Kontrolle war lediglich die große Streuung der Messwerte in der senilen Altersgruppe, die sowohl im Neocortex, als auch besonders stark im Hippocampus auftrat. Dies könnte auf einen milden Effekt der Mutation auf die Entstehung von Superoxidanionen hindeuten, welcher sich altersabhängig verstärkt und dessen Ausprägung interindividuell verschieden abläuft. Zu dieser Theorie könnte ebenfalls das Ergebnis der GFAP-Messung beitragen. Der GFAP-Gehalt im Hippocampus ist zu keinem der untersuchten Alterszeitpunkte von der Kontrolle abweichend. Allerdings kommt es bei den mt129S1-Tieren zu einem über alle Altersgruppen fortlaufenden Anstieg des GFAP-Signals, welches beim Kontrollstamm nur bis zur spät-adulten Altersgruppe ansteigt und danach stabil bleibt.

Überraschend war das signifikant schlechtere Lernvermögen der mt129S1-Mäuse im Alter von drei Monaten, zumal dies weder mit Veränderungen im mitochondrialen ROS-Gehalt noch im GFAP-Gehalt korreliert und damit nicht mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen erklärbar ist. Stattdessen könnte dieses Ergebnis auf die in der Altersgruppe 3-Monate unausgewogene Geschlechterverteilung (mt129S1: 27 % Männchen; mtAKR-Kontrolle: 47 % Männchen) der Gruppe für die Water Maze Versuche zurückzuführen sein. Studien, die die Lernleistung von Mäusen geschlechterspezifisch vergleichen, zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern sowohl bei der Zeit bis zum Auffinden der Plattform, als auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Auswerteparameter der geschwommenen Strecke, wobei männliche Mäuse in beiden Punkten besser abschneiden als weibliche (Fritz *et al.*, 2017). Es wäre folglich durchaus möglich, dass das signifikant schlechtere Lernvermögen der mt129S1-Tiere in der früh-adulten Gruppe als eine Art Artefakt allein der Geschlechterverteilung geschuldet ist. Andererseits könnte dieses Ergebnis auch auf eine milde Form der Belastungsintoleranz hindeuten. Dieser Phänotyp ist bei Menschen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Untereinheit von Komplex III vielfach beschrieben (Andreu *et al.*, 1999; Bruno *et al.*, 2003; Carossa *et al.*, 2014). Im Sinne schlechterer physischer Voraussetzungen wäre es für die mt129S1-Mäuse folglich schwerer, den gleichen Lernerfolg wie die Kontrolltiere zu erzielen. Diese Theorie würde zudem dadurch gestützt, dass in der senilen Altersgruppe eine (nicht signifikant) erhöhte Anzahl an

Tieren ($\frac{1}{3}$ der Versuchstiere) auf Grund ihrer physischen Konstitution nicht in der Lage war, den Schwimmversuch vollständig zu absolvieren. Da bei der Belastungsintoleranz vor allem Veränderungen im Herz- und Skelettmuskel sichtbar werden (Kitzman *et al.*, 2011), sollte sich zur Abklärung dieser Hypothese eine histologische Analyse dieser Gewebe anschließen. Es wäre allerdings auch möglich, dass bei den früh-adulten mt129S1-Mäusen tatsächlich ein lernbeeinträchtigter Phänotyp vorliegt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre zum Beispiel ein Szenario, welches auf die Organisation der Atmungskettenkomplexe aufbaut. So deuten zunehmend Studien daraufhin, dass sich die Proteinkomplexe in Abhängigkeit verschiedener Bedingungen, unter anderem zum Schutz vor ROS, zu sogenannten Superkomplexen zusammenlagern (Acin-Peréz *et al.*, 2014). Untersuchungen an Zellkulturen konnten zeigen, dass die Bildung von Superkomplexen in besonderem Maße von Komplex III (Acin-Peréz *et al.*, 2004) und Komplex IV (Diaz *et al.*, 2006) abhängig ist. Unter der Annahme, dass die Punktmutation in Komplex III des mt129S1-Stammes zum Beispiel durch eine Veränderung der Tertiär- beziehungsweise Quartärstruktur des Proteinkomplexes in der Folge zu einer verminderten ATP-Synthese führt, hätte dies besonders für Neuronen negative Folgen und könnte das beeinträchtigte Lernvermögen der früh-adulten Tiere erklären. In den nachfolgenden Altersgruppen würde diese Beeinträchtigung durch einen von Ghelli und Kollegen (Ghelli *et al.*, 2013) beschriebenen Gegenmechanismus behoben. Diese Arbeitsgruppe stellte 2013 fest, dass die Folgen einer Mutation in der Cytochrom b Untereinheit von Komplex III dadurch annähernd kompensiert wurden, dass der veränderte Komplex III vermehrt in Superkomplexe verpackt wurde (Ghelli *et al.*, 2013). Da die Bildung von Superkomplexen wahrscheinlich mit zunehmendem Alter ansteigt (Lombardi *et al.*, 2009), könnte darüber die Dysfunktion und letztlich eine verminderte ATP-Synthese ausgeglichen werden.

MtFVB – Die Veränderung in der mitochondrialen ATP-Synthase erhöht den GFAP-Gehalt im Hippocampus und die durchschnittliche Lebensdauer.

Der mitochondriale Atmungskettenkomplex V, die ATP-Synthase, ist das Schlüsselenzym der mitochondrialen ATP-Produktion. Er besteht aus siebzehn Untereinheiten, von denen zwei mitochondrial kodiert sind (Walker, 2013). Der Proteinkomplex setzt sich aus zwei Teilmodulen zusammen, dem hydrophilen F₁-Teil, welcher für die Synthese und Hydrolyse von ATP verantwortlich ist, und dem hydrophoben F₀ Teil, welcher Protonen aus dem Intermembranraum zurück in die Mitochondrienmatrix transloziert (Walker *et al.*, 1995; Stock *et al.*, 1999). Beim Menschen bekannte Mutationen in Komplex V kommen vor allem in den beiden mitochondrial kodierten Untereinheiten vor und sind mit der maternal vererbten Form des Leigh Syndroms (*atp6* Mutation) (Holt *et al.*, 1990) und hypertropher Cardiomyopathie (*atp8* Mutation) (Jonckheere *et al.*, 2008) assoziiert. Die Veränderung von Komplex-V-Untereinheiten beziehungsweise das gezielte Ausschalten von Komplex-V-assoziierten Faktoren zur Bildung von ATP-Synthase-defizienten Mausmodellen führte in den meisten Fällen bereits im Embryonalstadium zum Tod der Tiere (Vrbacký *et al.*, 2016). Daher gibt es nur wenige Mausmodelle, die zur Untersuchung von Komplex-V-Defizienz nutzbar sind. Bisher in der Literatur beschriebene Modelle zielen auf Veränderung von IF1 (*inhibitory factor 1*) ab, welcher die Hydrolyse von ATP zu ADP bei limitierter Substratmenge der Atmungskette verhindert und somit ein endogener Komplex-V-Regulator ist (Pullman *et al.*, 1963; Toracco *et al.*, 2015). Transgene Mäuse, die humanen IF1 in Neuronen überexprimieren, zeigen phänotypisch leicht erhöhten oxidativen Stress, eine verminderte Respiration, einen verminderten ATP-Gehalt und zusätzlich eine reduzierte Komplex-IV-Aktivität (Formentini *et al.*, 2014). Der Knockout von *if1* in Mäusen führte dagegen zu keinerlei phänotypischen Auffälligkeiten (Nakamura *et al.*, 2013). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mtFVB-Mäuse tragen eine Punktmutation im *atp8*-Gen (Yu *et al.*, 2009 und 2009b; Weiss *et al.*, 2012), die zu einem Aminosäureaustausch in der ATP8-Untereinheit von Komplex V führt. In vorangegangenen Studien von Partnerarbeitsgruppen aus dem ROSAge-Projekt wurden für den SNP der mtFVB-Mäuse eine Reihe von phänotypischen Veränderungen beobachtet: So wurde eine Prädisposition für Autoimmunerkrankungen (Yu *et al.*, 2009b) und ein verändertes Angstverhalten sowie eine veränderte Stressreaktion (Gimsa

et al., 2009) für diese Mäuse beschrieben. An isolierten Milzmitochondrien von 12-Monate alten mtFVB-Tieren konnte ein erhöhter Gehalt an Wasserstoffperoxid in Kombination mit einer erhöhten ATP-Synthase-Aktivität gemessen werden (Koch, 2011). In isolierten β -Zellen des endokrinen Pankreas wurde ebenfalls ein erhöhter Gehalt an mitochondrialem Superoxid gemessen (Weiss *et al.*, 2012). Damit erschien der mtFVB-Stamm zu Beginn der vorliegenden Arbeit als ein besonders aussichtsreicher Kandidat für veränderte ROS-Gehalte. Dies konnte mit der Messung des mitochondrialen Superoxids im Gehirn der Mäuse nicht oder nur sehr geringfügig bestätigt werden. Lediglich im Neocortex 12-Monate alter Tiere ergab die ROS-Messung einen erhöhten Superoxidgehalt. Dieser könnte durch eine erhöhte ATP-Synthase-Aktivität in den mtFVB-Tieren entstehen, wie sie für Mitochondrien aus Milzzellen beschrieben wurde (Koch, 2011). Die gesteigerte Aktivität führt ihrerseits zu einer Aktivitätssteigerung aller Atmungskettenkomplexe, wodurch im Gegenzug auch ein erhöhtes Anfallen von Sauerstoffradikalen zu erwarten ist. Da die Aktivität der ATP-Synthase in Abhängigkeit vom zellulären Energiebedarf reguliert wird (Das, 2003), könnte dies auf einen erhöhten Energiebedarf hindeuten. Warum dieser allerdings speziell bei der Altersgruppe 12-Monate und in den untersuchten Hirnregionen ungleichmäßig anfällt, kann aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden.

Ein Ergebnis, das bei der Untersuchung der mtFVB-Tiere auffiel, war der in allen Altersgruppen erhöht vorliegende GFAP-Gehalt im Hippocampus. Dieser könnte mit der erhöhten Aktivität der ATP-Synthase in den mtFVB-Tieren (Koch, 2011) in Zusammenhang stehen. Da unter Stressbedingungen mit erhöhtem ATP-Bedarf eine Steigerung der ATP-Synthase-Aktivität als Folge zu erwarten ist (Das, 2003), könnte eine langfristig erhöhte ATP-Synthase-Aktivität, beziehungsweise ein daraus resultierend erhöhter Gehalt an Wasserstoffperoxid (Koch, 2011), ein sinnvolles Signal zur Astrocytenaktivierung darstellen. Somit würde die Folge der Mutation von mtFVB im Sinne eines Dauerstresses gedeutet, was wiederum den erhöhten GFAP-Gehalt durch Astrocytenaktivierung erklären könnte.

Die Veränderung in der ATP8-Untereinheit zeigte als einzige der untersuchten Mutationen einen signifikant positiven Einfluss auf die Lebensdauer der Versuchstiere. Der Median der Überlebenszeit lag um fünf Prozent, beziehungsweise 42 Tage, höher als bei den Kontrolltieren, was bei Umrechnung in menschliche Lebenszeit unter Annahme einer Lebenserwartung von 80 Jahren beachtliche vier Jahre ausmachen

würde. Dieser Effekt könnte ebenfalls Folge einer erhöhten ATP-Synthase-Aktivität und eines daraus resultierenden erhöhten Gehaltes an Wasserstoffperoxid sein, wobei im Sinne der *Mitohormesis* dieser konstant vorkommende milde oxidative Stress Veränderungen hervorrufen würde, welche lebensverlängernd wirken (Ristow *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2014). In diesem Zusammenhang wäre zur weiteren Erforschung des Effektes eine systematische Untersuchung der Aktivität antioxidativer Proteine bei den mtFVB-Tieren interessant.

4.2 Der Einfluss von Punktmutationen in Genen der mitochondrialen tRNA

Bemerkenswerterweise betreffen die meisten in der Literatur beschriebenen pathogenen mtDNA-Mutationen mitochondriale tRNA-Gene (Zifa *et al.*, 2007; Schon *et al.*, 2012). Alle bisher beim Menschen als krankheitsbedingend beschriebenen tRNA-Mutationen sind in der mitochondrialen DNA lokalisiert (Abbot *et al.*, 2014). Anders als bei den plasmatischen tRNAs, die multiple paraloge Gene aufweisen (Chan und Lowe, 2009), können Mutationen in mitochondrialen tRNAs nicht kompensiert werden, da in der mtDNA jeweils nur eine Kopie der Gene vorliegt (Kirchner und Ignatova, 2015). Die ersten Veröffentlichungen, die tRNA-Mutationen und humane Krankheiten in Zusammenhang brachten, erschienen 1990: Kobayashi und Kollegen (Kobayashi *et al.*, 1990) beschrieben die Bedeutung einer Mutation in der mt-tRNA(Leu) bei der Entstehung von MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes) und Shoffner und Kollegen (Shoffner *et al.*, 1990) zeigten den Zusammenhang zwischen einer mt-tRNA(Lys)-Mutation und MERRF (Myoclonic epilepsy with ragged red fibers) auf.

Mt-tRNA-Mutationen, die die Funktion der Mitochondrien beeinflussen, werden inzwischen mit diversen Erkrankungen und pathologischen Bedingungen wie Myopathie, Encephalomyopathie, Ataxie, Belastungsintoleranz und Multi-Organ-Versagen in Zusammenhang gebracht (Blakely *et al.*, 2007; Yarham *et al.*, 2010; Lehmann *et al.*, 2015). Dabei scheint der Heteroplasmiegehalt von entscheidender Bedeutung für die Pathogenität der mt-tRNA-Mutation zu sein. So beschrieben zum Beispiel Zifa und Kollegen (Zifa *et al.*, 2007) eine Mutation in der mt-tRNA(Leu), welche bei einem Anteil von mehr als 60 % aller mtDNA-Kopien zunächst PEO

(Progressive external ophthalmoplegia) verursacht und erst bei einem Gehalt von mehr als 80 % zum deutlich schwerwiegenderen MELAS-Syndrom führt.

Vor diesem Hintergrund erschien es für die vorliegende Arbeit bedeutsam, den Einfluss von Punktmutationen in der mt-tRNA in Bezug auf deren Auswirkung auf das murine Gehirn in verschiedenen Altersgruppen zu untersuchen. Außerdem stellten die Mausstämme mit mt-tRNA(Arg) Veränderung eine Kontrollgruppe gegenüber dem mtNOD-Stamm mit Doppelmutation dar.

BL6 und mtAKR – Die alleinige Veränderung in der mt tRNA^{Arg} führt zu keinem phänotypischen Unterschied.

Die beiden Kontrollstämme BL6 und mtAKR unterscheiden sich im Gen der mitochondrialen Arginin-spezifischen tRNA an Position nt9821, wobei BL6 dort acht und mtAKR neun Adeninwiederholungen aufweist (Yu *et al.*, 2009). Dies führte bei den beiden Mausstämmen zu keinen unterschiedlichen Alters-Phänotypen. Zwar war der ROS-Gehalt im Neocortex der senilen Altersgruppe ungleich, dennoch waren die im Zusammenhang mit gesundem Altern besonders interessanten Parameter Lernvermögen und Lebensdauer bei beiden Stämmen gleich, so dass die Mutation hier offensichtlich als neutraler Polymorphismus eingestuft werden kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Sachadyn (Sachadyn *et al.*, 2008), die mit Hilfe von Strukturvorhersageprogrammen keine Veränderung in der Stabilität der tRNA erwarten ließen.

Nach Abschluss der eigenen Labor-Arbeiten wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Ibrahim, welche die conplastischen Mausstämme generiert hatte, publiziert, dass weibliche Mäuse des mtAKR-Stammes gegenüber BL6 eine signifikant verkürzte Lebenszeit aufwiesen (Hirose *et al.*, 2018), was mit dem Auftreten einer low-level 12-A Heteroplasmie an Position 5172 erklärt wird. Dieser Effekt konnte bei den für die vorliegende Arbeit verwendeten Tieren des mtAKR-Stammes nicht beobachtet werden (Log-Rang-Test $p = 0,223$; Median des Alters BL6: 820 Tage, mtAKR 818 Tage).

MtMRL – Die Kombination zweier tRNA-Mutationen erhöht stark den hippocampalen GFAP-Gehalt bei alten Mäusen.

Der mtMRL-Stamm wurde ursprünglich in die Arbeiten des ROSAge-Projektes aufgenommen, um als zusätzlicher Kontrollstamm für die Mäuse des mtNOD-Stammes zu fungieren. Da dieser sowohl eine Mutation im Bereich des Atmungskettenkomplexes IV als auch in der mitochondrialen Arginin-spezifischen tRNA aufweist, sollte der mtMRL-Stamm vorrangig die Zuordnung eines möglichen mtNOD-Phänotyps zu einer der beiden Mutationen ermöglichen. Idealerweise hätte mtMRL dafür nur die Veränderung an der mt tRNA^{Arg} aufweisen dürfen. Tatsächlich wurde von Sachadyn *et al.* 2008 eine weitere Mutation an Position nt3900 beschrieben, welche heteroplasmisch im Bereich der mitochondrial-kodierten Methionin-spezifischen tRNA auftritt. Dadurch konnte letztlich mit dem mtMRL-Stamm der Einfluß einer Kombination zweier tRNA-Mutationen untersucht werden.

Beide mt tRNAs, die bei den mtMRL-Mäusen von Mutation betroffenen sind, gelten, anders als mt tRNA^{Leu} und mt tRNA^{Lys} (Zifa *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2014), nicht als *hotspot* für humanpathogene Mutationen und werden in der Literatur jeweils nur an Hand weniger Einzelfälle im Zusammenhang mit mitochondrialer Myopathie diskutiert (Uusimaa *et al.*, 2004; Zifa *et al.*, 2007; Roos *et al.*, 2013; Kuwajima *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2019). Bei den mtMRL-Mäusen konnte kein Phänotyp detektiert werden, aus dem das Vorliegen einer mitochondrialen Myopathie ableitbar gewesen wäre. Die physische Konstitution der Tiere war in keinem der untersuchten Lebensalter gegenüber Kontrollmäusen verändert und die Lebenszeit war sogar tendenziell leicht erhöht (Median der Lebenszeit BL6: 802 Tage, mtAKR 801 Tage, mtMRL 829 Tage). Die einzige Besonderheit, die bei den mtMRL-Mäusen auffällig war, bestand in einer starken Veränderung des Verhältnisses von GFAP zu NeuN im Hippocampus von 24-Monate-alten Tieren. Dies könnte auf eine Aktivierung von Astrocyten und damit verbundener Steigerung der GFAP-Expression hinweisen (Hol und Pekny, 2015; Zhang *et al.*, 2017). Da GFAP eine wichtige Rolle im Antwortverhalten auf oxidativen Stress spielt und in diesem Zusammenhang wahrscheinlich essentiell für die Eliminierung von ROS ist (de Pablo *et al.*, 2013), zeigen die mtMRL-Mäuse damit möglicherweise eine besonders effektive Abwehr altersbedingt erhöhter ROS-Gehalte.

Andererseits könnte die Veränderung im GFAP zu NeuN Gehalt der senilen mtMRL-Mäuse auch im negativen Sinne einer Astrogliose den massiven Untergang von

Nervenzellen im Hippocampus der alten Tiere bedeuten (Sofroniew 2009; Middeldorp et al., 2011; Osborn et al., 2016). Dies wäre allerdings ein Faktor der die Lernleistung der Tiere stark beeinträchtigen müsste (O’Keefe *et al.*, 1978; Bliss *et al.*, 1993; Kumar 2011). Da sich die mtMRL-Tiere in den durchgeführten Lern-Experimenten aber unauffällig gegenüber den Kontrollstämmen zeigten, erscheint die negative Deutung des erhöhten GFAP-Signals eher unwahrscheinlich. Zur genaueren Abklärung wären allerdings Folgeexperimente nötig, die zum Beispiel weitere Markerproteine wie Vimentin und Nestin oder bekannte Astrogliose-Stimuli wie Interleukin-1 (Burda und Sofroniew, 2014) untersuchen sollten.

4.3 Der Einfluss einer Kombination von Punktmutationen in Genen der mitochondrialen Atmungskette und der tRNA

MtNOD – Die Kombination aus Komplex-IV- und tRNA^{Arg}-Mutation beeinträchtigt die Konstitution im Alter und verkürzt tendenziell die Lebenszeit.

Die Kombination aus Komplex-IV und tRNA^{Arg}-Mutation des mtNOD-Stammes zeigte einen ausgeprägten Phänotyp bei 24-Monate alten Mäusen. Waren die mtNOD-Tiere in den früh- und spätadulten Altersgruppen unauffällig gegenüber den Kontrolltieren, so zeigten sich in der senilen Altersgruppe deutliche Unterschiede in Form von erhöhtem Gehalt an mitochondrialem Superoxid und einer stark beeinträchtigten Konstitution unter physischer Belastung im Water Maze, die auf eine altersassoziierte Belastungsintoleranz hindeuten könnte. Die Lebensdauer der Tiere war tendenziell vermindert ($p = 0,17$), wobei sich ein Unterschied zur Kontrolle erst bei Tieren älter als 800 Tage zeigte, beziehungsweise zu längerlebenden Stämmen (mtFVB ; mtMRL) signifikant war. Die Frage, die sich aus dem beobachteten Phänotyp ergab, war: Entsteht der Phänotyp tatsächlich durch die Kombination beider Mutationen, oder lässt er sich auf eine einzelne zurückführen?

Mutationen der tRNA sind mehrfach im Zusammenhang mit mitochondrialer Dysfunktion und assoziierter Belastungsintoleranz beschrieben worden (Blakely *et al.*, 2007; Yarham *et al.*, 2010). Trotzdem lässt sich die Mutation in der mt-tRNA^{Arg} leicht als alleinige Ursache für den Phänotyp ausschließen. Der mtMRL-Stamm zeigte keine phänotypischen Ähnlichkeiten mit mtNOD: Während bei mtNOD der Gehalt an

mitochondrialem ROS mit dem Alter anstieg, blieb er bei mtMRL in allen Altersgruppen auf einem annähernd gleichen Niveau. Der GFAP-Gehalt im Hippocampus dagegen war bei mtMRL-Mäusen im Alter von 24 Monaten massiv erhöht, bei mtNOD-Mäusen hingegen unauffällig. Auch zeigten mtMRL-Mäuse eine dem Kontrollstamm vergleichbare Konstitution im senilen Alter und sogar eine tendenziell erhöhte Lebensdauer ($p = 0,06$).

Die Mutation im Atmungskettenkomplex IV isoliert zu betrachten, ist dagegen ungleich schwieriger, da kein Vergleichsmodell existiert, welches den SNP an Position nt9348 als alleinige Mutation trägt. Allerdings ist von Mausmodellen mit Komplex-IV-Defizienz eine große Bandbreite unterschiedlicher Phänotypen bekannt (Torraco *et al.*, 2015): Beispielsweise wurde von Radford und Kollegen ein Modellstamm entwickelt, bei dem die kernkodierte Untereinheit COXVIaH durch genetischen Knockout ausgeschaltet wurde (Radford *et al.*, 2002). Die Aktivität des Atmungskettenkomplexes IV war in COXVIaH^{-/-}-Mäusen auf bis zu 23 % des Normalwertes abgesenkt und die Tiere entwickelten eine diastolische Herzinsuffizienz. Trotzdem waren sie lebensfähig und zeigten unveränderte Lebenszeitspannen. SURF1 ist ein Protein, das für einige Schritte der Assemblierung von Komplex IV aus seinen Untereinheiten essentiell ist (Williams *et al.*, 2001). Mutationen im *surf1*-Gen verursachen beim Menschen schwere neurologische Krankheiten, wie das Leigh-Syndrom, welches bereits nach zwei bis drei Lebensjahren zum Tod führt. *Surf1*-Knockout-Mäuse zeigten eine leichte Abnahme der Komplex-IV-Aktivität auf 30 - 40 % der Normalwerte im Gehirn, Herz, in der Leber und in den Skelettmuskeln (Dell'agnello *et al.*, 2007). Überraschenderweise waren diese Mäuse phänotypisch unauffällig beziehungsweise zeigten in Lernversuchen sogar eine verbesserte Gedächtnisleistung und eine um fünf Monate längere Lebenszeit als Kontrolltiere. *Sco2* kodiert ein Chaperon, welches ebenfalls bei der Zusammensetzung von Komplex IV aus seinen Untereinheiten von entscheidender Bedeutung ist (Leary *et al.*, 2009). Die Arbeitsgruppe um Yang entwickelte zwei Mausmodelle mit gestörtem SCO2-Protein (*Sco2*^{KI/KI} und *Sco2*^{KO/KI}), bei denen es zu verminderter Komplex-IV-Aktivität und einer Akkumulation von Komplex-IV-Intermediaten in Herz-, Hirn-, Muskel- und Lebergewebe kam (Yang *et al.*, 2010). Obwohl SCO2-defiziente Menschen bereits im Kindesalter an einer Kombination aus Kardiomyopathie und Myopathie versterben, zeigten die Mausmodelle keinerlei Kardiomyopathie, stattdessen eine milde Form der Myopathie und eine normale Lebenszeitspanne. Es sind allerdings auch Komplex-IV-defiziente Mausmodelle entwickelt worden, welche einen deutlich

krankhaften Phänotyp mit eingeschränkter Lebenserwartung aufweisen, wie die *cox10*-Knockout-Mäuse. Das Genprodukt von *cox10* katalysiert den ersten Schritt der Biosynthese von Häm a, einer prosthetischen Gruppe, die essentiell für die Funktion von Komplex IV ist (Antonicka *et al.*, 2003b). Die Arbeitsgruppe um Diaz entwickelte ein Set von gewebespezifischen *cox10*-Knockout-Mäusen (Diaz *et al.*, 2005). *Cox10-Mlc-1f*-Mäuse sind ein Myopathiemodellstamm und weisen eine stark verminderte Komplex-IV-Aktivität (13 % des Normalwertes) in den Skelettmuskeln auf, welche zudem altersassoziiert weiter abnimmt. Die Tiere versterben früh im Alter von sechs Monaten. *Cox10-CaMKIIa*-Knockout-Mäuse sind als Modell für Encephalomyopathie etabliert (Diaz *et al.*, 2012). Sie entwickeln eine progressive Komplex-IV-Dysfunktion im Bereich des Vorderhirns. Dadurch zeigen die Tiere abnormales Verhalten und eine starke kortikale Atrophie, welche zum vorzeitigen Versterben im Alter von zehn bis zwölf Monaten führt. Neurone des Gyrus cinguli und des Hippocampus sind bei diesen Mäusen in besonderer Weise vom mitochondrialen Defekt betroffen und haben stark erhöhte ROS-Gehalte und bilden eine Gliose aus. Alle diese Komplex-IV-Modelle ähneln wenig bis gar nicht dem in dieser Arbeit untersuchten mtNOD-Stamm, welcher weder eine dramatisch reduzierte Lebenserwartung noch eine hippocampale Gliose oder einen starken ROS-Anstieg im Hippocampus zeigte. Das einzige Mausmodell, bei dem bisher eine Belastungsintoleranz im Zusammenhang mit Komplex-IV-Veränderung beschrieben wurde, sind *Cox7a1*-Knockout-Mäuse. COX7A1 ist die Herz- und Skelettmuskel spezifische Isoform von COX7A, welches wahrscheinlich die Aktivität von Komplex IV an den gewebespezifischen Energiebedarf anpasst (Toracco *et al.*, 2015). Die *Cox7a1*-Knockout-Mäuse entwickeln im Alter von sechs Wochen eine Kardiomyopathie, welche im weiteren Leben durch kompensatorische Effekte einen milden Verlauf ohne phänotypische Besonderheiten nimmt (Huttemann *et al.*, 2012). Erst unter physischer Belastung zeigen diese Mäuse eine deutlich verminderte Leistungsfähigkeit (Lee *et al.*, 2012). Allerdings tritt diese bereits im Alter von sechs Monaten zu Tage, wohingegen die hier untersuchten mtNOD-Mäuse bis zu einem Alter von zwölf Monaten unauffällig waren und sich erst in der senilen Altersgruppe von den Kontrolltieren unterschieden. Interessanterweise korreliert die schlechte physische Konstitution der senilen mtNOD-Tiere mit einem signifikant höheren Superoxid-Gehalt im Neocortex. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Befunden ließe sich über die essentielle Bedeutung einiger Neocortexfunktionen für das Absolvieren der Water Maze-Aufgabenstellung, vornehmlich der sensorischen Perzeption, der

Generierung motorischer Kommandos und des räumlichen Denkens (Lodato *et al.*, 2015), finden. Veränderungen im Superoxidgehalt könnten die zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen destabilisieren, da ausbalancierte Superoxidgehalte Grundlage wichtiger Zellfunktionen sind (Knapp *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2004). Überdies ist davon auszugehen, dass Effekte in anderen Organsystemen, vornehmlich Herz- und Skelettmuskel, entscheidend zur Ausprägung des Phänotyps der Belastungsintoleranz der mtNOD-Mäuse beitragen.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass der mtNOD-spezifische Phänotyp vornehmlich durch die Komplex-IV-Mutation entsteht, wobei die tRNA-Mutation die Auswirkungen der Komplex-IV-Veränderung möglicherweise noch intensiviert oder kompensatorische Mechanismen lahmlegt. Für weiterführende Studien wären beim mtNOD-Stamm sicherlich zwei Fragestellungen als interessant zu erachten:

1. Gibt es bei den 24-Monate alten Tieren Veränderungen in anderen Organen, vornehmlich Herz- und Skelettmuskel, durch welche sich die beobachtete Belastungsintoleranz erklären lässt?
2. Entsteht der altersabhängige Phänotyp des mtNOD-Stammes durch eine Akkumulation von Schäden mit dem Altern, welche erst nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes phänotypisch sichtbar werden? Oder sind, wie zunehmend in der Literatur diskutiert (Ross *et al.*, 2014), bereits früh im Leben auftretende Effekte dafür verantwortlich, dass mtNOD-Mäuse anders altern.

4.4 UCP2 Knockout als Positivkontrolle für mitochondriale Dysfunktion

UCP2^{-/-} - *Der Knockout von UCP2 führt zu Veränderungen in allen untersuchten Altersgruppen mit besonders negativer Ausprägung bei alten Tieren.*

Uncoupling Proteine gehören zur Familie der mitochondrialen Transportproteine und sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Rousset *et al.*, 2004). Derzeit sind fünf Vertreter dieser Proteinfamilie bekannt (UCP1-5). UCP2 weist eine innerhalb der Gruppe der Säugetiere hochgradig konservierte Sequenz auf (Ledesma *et al.*, 2002; Mattiasson *et al.*, 2006) und wird in verschiedenen Geweben, darunter auch das zentrale Nervensystem, exprimiert (Andrews *et al.*, 2005). Die Bedeutung der ursprünglich namensgebenden Funktion des Entkoppelns von ATP-Produktion und mitochondrialer Atmungskette wird für UCP2 diskutiert (Krauss *et al.*, 2002; Bouillaud, 2009). Darüber hinaus scheint UCP2 entscheidend an der metabolischen Regulation des Glucosestoffwechsels beteiligt zu sein, indem es den Export von C4-Metaboliten aus Mitochondrien ermöglicht (Vozza *et al.*, 2014). Polymorphismen im *ucp2*-Gen wurden mehrfach mit veränderter Lebensdauer in Zusammenhang gebracht (Rose *et al.*, 2011; Barbieri *et al.*, 2012) und das Ausschalten von UCP2 durch Knockout führt zu einer deutlich reduzierten Lebenszeitspanne (Fridell *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2006; Andrews *et al.*, 2009; Hirose *et al.*, 2016). Dieser Zusammenhang konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, die mittlere Lebenszeit der UCP2^{-/-}-Mäuse war im Vergleich zur BL6-Kontrolle um 121 Tage deutlich reduziert. Aber wie kann UCP2 als mitochondriales Membranprotein die Lebensdauer beeinflussen? Als einer der wesentlichen Gründe für das vorzeitige Altern der UCP2-Knockout-Mäuse wird in der Literatur ein erhöhter Gehalt an Sauerstoffradikalen diskutiert (Andrews *et al.*, 2009). Dieser konnte in der vorliegenden Arbeit für mitochondriales Superoxid sowohl im Hippocampus als auch im Neocortex nachgewiesen werden, allerdings zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten (im Hippocampus bei früh-adulten Tieren, im Neocortex bei spät-adulten Tieren). Der *Theorie der freien Radikale* folgend ließe sich darüber ein vorzeitiges Altern der Mäuse durch vermehrte Ansammlung von Schädigungen und gleichzeitig die deutlich schlechtere Konstitution im Alter von 24 Monaten erklären. Interessanterweise wurde bei senilen UCP2^{-/-}-Tieren kein erhöhter, sondern im Hippocampus sogar ein signifikant verminderter Gehalt an mitochondrialem Superoxid festgestellt. Dies könnte auf einen Adaptionsmechanismus an chronisch

erhöhtes Superoxid hinweisen. De Bilbao und Kollegen haben 2004 für UCP2^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Aktivität der Mn-SOD gemessen (de Bilbao *et al.*, 2004). Darüber wäre die beobachtete Normalisierung, beziehungsweise Reduzierung, des Superoxidgehaltes bei den 24-Monate alten Tieren erklärbar. Als Resultat einer erhöhten Mn-SOD-Aktivität wäre ein erhöhter Gehalt an Wasserstoffperoxid zu erwarten (Buettner *et al.*, 2006; 2011). Da Wasserstoffperoxid dafür bekannt ist, in Mengen oberhalb physiologischer Konzentrationen die synaptische Übertragung zu inhibieren (Avshalumov *et al.*, 2000), wäre in der senilen Altersgruppe zudem ein Lerndefizit zu erwarten, welches mit dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Test des Morris Water Maze auf Grund der schlechten allgemeinen Konstitution der alten UCP2^{-/-}-Mäuse nicht überprüft werden konnte. Dies sollte, zusammen mit der Messung von Wasserstoffperoxidgehalten, in weiterführenden Versuchen mit einem weniger stark von der Physis abhängenden Versuchssparadigma überprüft werden.

Interessanterweise zeigten die früh-adulten UCP2^{-/-}-Mäuse ein signifikant schlechteres räumliches Lernvermögen als gleichaltrige Kontrolltiere, wobei in der Literatur auch für andere Lern- und Verhaltensformen eine negative Auswirkung des UCP2-Knockouts in jungen Tieren beschrieben wurde (Gimsa *et al.*, 2011; Simon-Areces *et al.*, 2012). Da in dieser Altersgruppe gleichzeitig der Gehalt an Superoxid im Hippocampus hoch ist, muss hier ein anderer Grund als ein kompensatorisch erhöhter Wasserstoffperoxidgehalt angenommen werden. Andrews und Kollegen spekulieren in einem Übersichtsartikel, dass eine Störung der synaptischen Übertragung in UCP2^{-/-} auf den Verlust der Entkopplungsfunktion zurückzuführen sei (Andrews *et al.*, 2005). Ohne Entkoppeln fehlt ein entscheidender Regulationsmechanismus, wodurch ein höherer Gradient an der Mitochondrienmembran besteht und folglich das mitochondriale Membranpotenzial ansteigt. Dadurch würden vermehrt Calciumionen in die Mitochondrien aufgenommen werden, was einerseits die für die synaptische Übertragung entscheidende Calciumhomöostase direkt beeinträchtigt und zum anderen kann durch eine Calciumüberladung der Mitochondrien der Untergang der entsprechenden Zelle eingeleitet werden.

Der signifikant niedrigere Gehalt an mitochondrialem Superoxid im Hippocampus von 24 Monate alten UCP2^{-/-}-Mäusen korreliert mit einem signifikant erniedrigten Verhältnis von GFAP zu NeuN. Dies würde erneut (ebenso wie die Ergebnisse beim mtALR-Stamm) für eine Signalfunktion von ROS, möglicherweise direkt als Sensor (de Pablo *et al.*, 2013), bei der Aktivierung von Astrocyten sprechen. Da der Gehalt an

mitochondrialem Superoxid im Hippocampus der senilen UCP2^{-/-}-Tiere niedrig ist, kommt es folglich auch zu keinem GFAP-Anstieg.

4.5 Abschließende Betrachtungen

Aktuelle Diskussionen zum Thema Altern und ROS suchen vor allem den Zusammenhang zwischen Mutationen in der mtDNA und mitochondrialen ROS. Sind sie Ursache oder Folgeerscheinung von mtDNA-Mutationen? Daher war von besonderem Interesse, ob die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodelle grundsätzlich veränderte Gehalte an mitochondrialen ROS aufweisen. Da die Mausstämme diesbezüglich sehr heterogene Phänotypen zeigten, kann dazu keine einheitliche Aussage getroffen werden: Die Mausstämme mit einzelner Punktmutation in einem Atmungskettenkomplex-Gen oder einem tRNA-Gen zeigten keine beziehungsweise nur geringfügige und nicht über alle Altersgruppen konstant bestehende Veränderungen im Gehalt an mitochondrialen Superoxidanionen. Deutliche Unterschiede in den ROS-Gehalten wurden nur für den Stamm mit der Kombination aus Atmungsketten- und tRNA-Gen-Mutation (mtNOD) sowie für den UCP2-Knockoutstamm festgestellt. Dabei scheint sich in diesen beiden Stämmen die Wirkung der Mutationen im Verlauf des Alterns zu verändern. Bei mtNOD kam es zu einer Potenzierung, da erst in der letzten untersuchten Altersgruppe signifikante Abweichungen zu den Kontrolltieren auftraten. Beim UCP2^{-/-} Stamm war der ROS-Gehalt zu Beginn des Lebens deutlich erhöht und kehrte sich über die Lebenszeit um zu einem verminderten ROS-Spiegel im Alter.

Die Änderungen bezüglich des Superoxidgehaltes in Kombination mit den gemessenen GFAP-Signalen könnten bei den Stämmen mtFVB, mtMRL und UCP2^{-/-} für eine mögliche Signalfunktion von ROS zur Astrocytenaktivierung sprechen. Allerdings muss dahinter ein deutlich komplexerer Mechanismus als eine direkte Sensorfunktion angenommen werden, da der mtNOD Stamm trotz Anstieg im Superoxidgehalt keine signifikanten Änderungen beim GFAP aufwies.

Anhand des UCP2^{-/-} Stammes zeigte sich klar ein Zusammenhang zwischen veränderten ROS-Gehalten im Hippocampus und der Lernleistung im Watermaze. Dies unterstreicht einerseits die Bedeutung eines funktionellen *Uncoupling* für die Aufrechterhaltung

wichtiger zellulärer Prozesse, sowie die Schlüsselrolle einer ausgewogenen ROS-Balance für die zelluläre Homöostase. Dafür spricht überdies auch die deutlich verminderte Lebensdauer von UCP2^{-/-}.

Abseits des bereits als Modellstamm etablierten UCP2^{-/-} sind von den konplastischen Mausstämmen vor allem der mtNOD- und der mtFVB-Stamm hervorzuheben. MtNOD zeigte erhöhte Superoxidgehalte im Alter von 24 Monaten und eine tendenziell kürzere Lebensdauer. MtFVB hatte in allen Altersgruppen ein erhöhtes GFAP-Signal und eine signifikant längere Lebensdauer. Somit wäre eine weitere Charakterisierung der Auswirkungen der jeweiligen Mutation auf die Mitochondrien interessant. Hier wäre zum Beispiel die Messung sekundärer ROS-Spezies, vor allem die Messung des sehr reaktiven Hydroxylradikals (Kauppila und Stewart, 2015), denkbar. Außerdem sollten Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit der Mitochondrien folgen, bei denen sowohl die Struktur des gesamten mitochondrialen Netzwerkes als auch einzelne Mitochondrienparameter, wie zum Beispiel das mitochondriale Membranpotenzial, der ATP-Gehalt oder die Aktivität der Atmungskettenkomplexe, im Mausgehirn analysiert werden. Da Altern eigentlich eine kontinuierliche Variable darstellt, wäre es überdies sinnvoll, mehr als die in der vorliegenden Arbeit untersuchten drei Alterszeitpunkte zu analysieren. Gerade zwischen der spät-adulter und der senilen Gruppe besteht die Gefahr, wichtige Veränderungen zu übersehen oder zu spät einzuordnen. Dies sollte durch eine engmaschige Untersuchung der mitochondrialen DNA zur möglichen Anreicherung mit erworbenen Mutationen abgerundet werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, altersspezifische Effekte von Polymorphismen der mitochondrialen DNA zu charakterisieren. Dazu wurden sechs conplastische Mausstämme, der BL6-Kontrollstamm und der UCP2-Knockoutstamm zu drei verschiedenen Alterszeitpunkten (3, 12 und 24 Monate) untersucht. Der Einfluss der jeweiligen Mutationen wurde sowohl global auf die Lebensdauer, als auch im Speziellen auf das murine Gehirn analysiert. Da mitochondriale Sauerstoffradikale in mehreren Altershypothesen eine zentrale Bedeutung einnehmen, stand die Analyse von mitochondrialen ROS dabei im Fokus. Aktuelle Diskussionen in der Literatur gehen vor allem der Frage nach, wie diese mit Mutationen in der mtDNA zusammenhängen. Sind sie Ursache oder Folgeerscheinung von mtDNA-Mutationen? Daher war in der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse, ob die Mausmodelle grundsätzlich veränderte Gehalte an mitochondrialem Superoxid aufweisen, oder ob sich erst im Verlauf des Alterns Unterschiede zwischen den Stämmen einstellen? Die untersuchten Mausstämme mit einzelner Punktmutation in einem Atmungskettenkomplex-Gen oder einem tRNA-Gen zeigten keine beziehungsweise nur geringfügige und nicht über alle Altersgruppen konstant bestehende Veränderungen im Gehalt an mitochondrialen Superoxidationen. Deutliche Unterschiede in den ROS-Gehalten wurden nur für den Stamm mit der Kombination aus Atmungsketten- und tRNA-Gen-Mutation (mtNOD) sowie für den UCP2-Knockoutstamm festgestellt. Dabei zeigte sich überdies ein altersabhängiger Effekt in der Wirkung der Mutationen. Bei mtNOD kam es zu einer Potenzierung, welche in der letzten untersuchten Altersgruppe zu stark erhöhtem ROS führte. Beim UCP2^{-/-}-Stamm war der ROS-Gehalt zu Beginn des Lebens deutlich erhöht und kehrte sich über die Lebenszeit um zu einem verminderten ROS-Spiegel im Alter.

Da Altern einen der Hauptrisikofaktoren für viele neurodegenerative Erkrankungen darstellt, galt es weiterhin, mögliche Veränderungen in der Zellzusammensetzung im Gehirn der Mausmodelle zu untersuchen. Dazu wurde das Mengenverhältnis von Neuronen zu Astrocyten über die Markerproteine NeuN und GFAP quantifiziert. Hierbei fiel erneut der UCP2^{-/-}-Stamm auf, da im Hippocampus der 24-Monate-alten Tiere signifikant weniger GFAP-Signal messbar war. Außerdem zeigte sich beim Stamm mit Mutation im Atmungskettenkomplex V (mtFVB) ein über die gesamte Lebensdauer anhaltender erhöhter GFAP-Gehalt und beim Mausstamm mit alleinigen

tRNA-Mutationen (mtMRL) ein stark erhöhtes Astrocytenmarkersignal in der letzten untersuchten Altersgruppe. Diese Ergebnisse könnten in Kombination mit den gemessenen Superoxidgehalten für eine mögliche Signalfunktion von ROS zur Astrocytenaktivierung sprechen.

Um einen funktionellen Bezug zwischen möglichen auf Zellebene beobachteten Veränderungen und *in vivo* Prozessen feststellen zu können, wurde das Lernvermögen der Versuchstiere mittels Morris Water Maze untersucht. Dabei wurde für alle Mausstämmen eine mit zunehmendem Alter schlechter werdende Lernleistung detektiert. Der UCP2^{-/-}-Stamm zeigte in der Altersgruppe von drei Monaten klar einen Zusammenhang zwischen erhöhtem ROS-Gehalt im Hippocampus und einem schlechteren Lernvermögen im Watermaze. Dies unterstreicht die Schlüsselrolle einer ausgewogenen ROS-Balance für die zelluläre Homöostase.

Dafür spricht überdies auch die deutlich verminderte Lebensdauer von UCP2^{-/-}. Bei den konplastischen Mausstämmen gab es keine signifikant verkürzten Lebenszeiten, lediglich der mtNOD-Stamm mit Kombination zweier Mutationen hatte tendenziell eine verminderte Lebensdauer. Zu einer verlängerten Lebenszeit führte dagegen die Punktmutation im Gen der ATP-Synthase beim mtFVB-Stamm. Diese Tiere lebten im Mittel 42 Tage länger als Kontrolltiere, was bei Umrechnung in menschliche Lebenszeit (unter Annahme einer Lebenserwartung von 80 Jahren) beachtliche vier Jahre ausmachen würde. Dieser Effekt könnte im Sinne der *Mitohormesis* - Hypothese als Folge einer erhöhten ATP-Synthase-Aktivität und eines daraus resultierenden leicht erhöhten ROS-Gehaltes auftreten.

6 Literaturverzeichnis

- Abbot J, Francklyn CS, Robey-Bond SM (2014) Transfer RNA and human disease. *Frontiers in Genetics*, 5, DOI: 10.3389/fgene.2014.00158
- Acin-Pérez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernández-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C, Moraes CT, Enríquez JA (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular Cell*, 13, 805-815
- Acin-Pérez R, Enríquez JA (2014) The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837, 444–450
- Adam-Vizi V (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7, 1140-1149
- Alle H, Roth A, Geiger JR (2009) Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science*, 325, 1405-1408
- Allen NJ, Barres BA (2005) Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Current opinion in Neurobiology*, 15, 542–548
- Ameur A, Stewart JB, Freyer C, Hagström E, Ingman M, Larsson NG, Gyllenstein U (2011) Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: mutational patterns and their origins. *PLoS Genetics*, 7, e1002028
- Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, DiMauro S (1999) Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, 341, 1037-1044
- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL (2005) Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: In support of function and survival. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 829-840
- Andrews ZB, Horvath TL (2009) Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 296, 621-627
- Antonicka H, Ogilvie I, Taivassalo T, Anitori RP, Haller RG, Vissing J, Kennaway NG, Shoubridge EA (2003a) Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 43081-43088
- Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, Shoubridge EA (2003b) Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, 72, 101-114

- Antunes F, Cadenas E (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *Febs Letters*, 475, 121-126
- Archer SL (2013) Mitochondrial dynamics - mitochondrial fission and fusion in human diseases. *The New England Journal of Medicine*, 369, 2236-2251
- Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature Genetics*, 26, 435-439
- Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21, 1133-1145
- Avshalumov MV, Chen BT, Rice ME (2000) Mechanisms underlying H₂O₂-mediated inhibition of synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 882, 86-94
- Baltrusch S (2016) Mitochondrial network regulation and its potential interference with inflammatory signals in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 59, 683-687
- Barbieri M, Boccardi V, Esposito A, Papa M, Vestini F, Rizzo MR, Paolisso G (2012) A/ASP/VAL allele combination of IGF1R, IRS2, and UCP2 genes is associated with better metabolic profile, preserved energy expenditure parameters, and low mortality rate in longevity. *Age*, 34, 235-245
- Barel O, Shorer Z, Flusser H, Ofir R, Narkis G, Finer G, Shalev H, Nasasra A, Saada A, Birk OS (2008) Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *The American Journal of Human Genetics*, 82, 1211-1216
- Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ (2004) Higher respiration activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49883-49888
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo Journal*, 22, 4212-4222
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti J (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, 14, 724-738
- Bereiter-Hahn J, Voth M (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria. *Microscopy Research and Technique*, 27, 198-219
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464, 529-535
- Bjelakovic G, Nikolova D, Glud LL, Simonetti RG, Glud C (2008) Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 2, CD007176

- Blagosklonny MV (2003) Cell senescence and hypermitogenic arrest. *Embo Reports*, 4, 358-362
- Blakely EL, Swalwell H, Petty RKH, McFarland R, Turnbull DM, Taylor RW (2007) Sporadic myopathy and exercise intolerance associated with the mitochondrial 8328G>A tRNALys mutation. *Journal of Neurology*, 254, 1283-1285
- Bliss TVP, Collingridge GLA (1993) A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39
- Bogenhagen D, Clayton DA (1977) Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*, 11, 719-727
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125, 811-826
- Bouillaud F (2009) UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787, 377-383
- Brand MD, Esteves TC (2005) Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*, 2, 85-93
- Brandt U (2006) Energy converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annual Reviews Biochemistry*, 75, 69-92
- Bruno C, Santorelli FM, Assereto S, Tonoli E, Tessa A, Traverso M, Scapolan S, Bado M, Tedeschi S, Minetti C (2003) Progressive exercise intolerance associated with a new muscle-restricted nonsense mutation (G142X) in the mitochondrial cytochrome b gene. *Muscle and Nerve*, 28, 508-511
- Bua E, Johnson J, Herbst A, Delong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM (2006) Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *American Journal of Human Genetics*, 79, 469-480
- Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VGJ, Schafer FQ (2006) A new paradigm: Manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 1338-1350
- Buettner GR (2011) Superoxide dismutase in redox biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11, 341-346
- Burda JE, Sofroniew MV (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81, 229-48
- Brieba LG, Eichman BF, Kokoska RJ, Doublié S, Kunkel TA, Ellenberger T (2004) Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase. *EMBO Journal*, 23, 3452-3461

- Camandola S, Mattson MP (2017) Brain metabolism in health, aging and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 36(11), 1474-1492
- Carossa V, Ghelli A, Tropeano CV, Valentino ML, Iommarini L, Maresca A, Caporali L, La Morgia C, Liguori R, Barboni P, Carbonelli M, Rizzo G, Tonon C, Lodi R, Martinuzzi A, De Nardo V, Rugolo M, Ferretti L, Gandini F, Pala M, Achilli A, Olivieri A, Torroni A, Carelli V (2014) A novel in-frame 18-bp microdeletion in MT-CYB causes a multisystem disorder with prominent exercise intolerance. *Human Mutations*, 35, 954-958
- Chan PP, Lowe TM (2009) GtRNAdb: a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acid Research*, 37, D93-97, DOI:10.1093/nar/gkn787
- Chen ZG, Li TQ, Hindmarsh T (2001) Diffusion tensor trace mapping in normal adult brain using single-shot EPI technique. A methodological study of the aging brain. *Acta Radiologica*, 42, 447-458
- Conti B, Sanchez-Alavez M, Winsky-Sommerer R, Morale MC, Lucero J, Brownell S, Fabre V, Huitron-Resendiz S, Henriksen S, Zorrilla EP, de Lecea L, Bartfai T (2006) Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased lifespan. *Science*, 314, 825-828
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim NA (1992) Pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial-DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 7370-7374
- Das AM (2003) Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 79, 71-82
- Daverey A, Agrawal SK (2016) Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. *Neuroscience*, 333, 92-103
- de Bilbao F, Arsenijevic D, Vallet P, Hjelle OP, Ottersen OP, Bouras C, Raffin Y, Abou K, Langhans W, Collins S, Plamondon J, Alves-Guerra MC, Haguenaer A, Garcia I, Richard D, Ricquier D, Giannakopoulos P (2004) Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels. *Journal of Neurochemistry*, 89, 1283-1292
- De Leon MJ, Ferris SH, George AE, Reisberg B, Christman DR, Kricheff II, Wolf AP (1983) Computed tomography and positron emission transaxial tomography evaluations of normal aging and Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 3, 391-394
- Dell'agnello C, Leo S, Agostino A, Szabadkai G, Tiveron C, Zulian A, Prella A, Roubertoux P, Rizzuto R, Zeviani M (2007) Increased longevity and refractoriness to Ca(2+)-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Human Molecular Genetics*, 16, 431-444
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(3), 429-438

- Desquilbet L, Jacobson LP, Fried LP, Phair JP, Jamieson BD, Holloway M, Margolick JB; Multicenter AIDS Cohort Study (2007) HIV-1 infection is associated with an earlier occurrence of a phenotype related to frailty. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 62, 1279-1286
- Diaz F, Thomas CK, Garcia S, Hernandez D, Moraes CT (2005) Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Human Molecular Genetics*, 14, 2737-2748
- Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes CT (2006) Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Molecular Cell Biology*, 26, 4872-4881
- Diaz F, Kotarsky H, Fellmann V, Moraes CT (2011) Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 16, 197-204
- Diaz F, Garcia S, Padgett KR, Moraes CT (2012) A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Human Molecular Genetics*, 21, 5066-5077
- Dufor E, Larsson NG (2004) Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658, 122-132
- D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris Water Maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, 36, 60-90
- Elson JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF (2001) Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *American Journal of Human Genetics*, 68, 802-806
- Fearnley IM, Walker JE (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1140, 105-134
- Filosa A, Paixão S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B, Gaitanos L, Rudhard Y, Schoepfer R, Klopstock T, Kullander K, Rose CR, Pasquale EB, Klein R (2009) Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nature Neuroscience*, 12, 1285-1292
- Finch CE (2009) Update on slow aging and negligible senescence – a mini-review. *Gerontology*, 55, 307-313
- Formentini L, Pereira MP, Sanchez-Cenizo L, Santacatterina F, Lucas JJ, Navarro C, Martinez-Serrano A, Cuezva JM (2014) In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *The EMBO Journal*, 33, 762-778
- Fridell YWC, Sánchez-Blanco A, Silvia BA, Helfand SL (2005) Targeted expression of the human uncoupling protein 2 (hUCP2) to adult neurons extends life span in the fly. *Cell Metabolism*, 1, 145-152

- Fromholt P, Mortensen DB, Torpdahl P, Bender L, Larsen P, Rubin DC (2003) Life-narrative and word-cued autobiographical memories in centenarians: comparisons with 80-year-old control, depressed, and dementia groups. *Memory*, 11, 81-88
- Ghelli A, Tropeano CV, Calvaruso MA, Marchesini A, Iommarini L, Porcelli AM, Zanna C, De Nardo V, Martinuzzi A, Wibrand F, Vissing J, Kurelac I, Gasparre G, Selamoglu N, Daldal F, Rugolo M (2013) The cytochrome b p. 278YNC mutation causative of a multisystem disorder enhances superoxide production and alters supramolecular interactions of respiratory chain complexes. *Human Molecular Genetics*, 22, 2141–2151
- Gil-Pagés M, Stiles RJ, Parks CA, Neier SC, Radulovic M, Oliveros A, Ferrer A, Reed BK, Wilton KM, Schrum AG (2013) Slow angled-descent forepaw grasping (SLAG): an innate behavioral task for identification of individual experimental mice possessing functional vision. *Behavioral and Brain Functions*, 9, 35
- Gimsa U, Kanitz E, Otten W, Ibrahim SM (2009) Behavior and stress reactivity in mouse strains with mitochondrial DNA variations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 131-138
- Gimsa U, Kanitz E, Otten W, Aheng C, Tuchscherer M, Ricquier D, Miroux B, Ibrahim SM (2011) Alterations in anxiety-like behavior following knockout of the uncoupling protein 2 (ucp2) gene in mice. *Life Sciences*, 89, 677-684
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Vina J (2008) Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 142-149
- Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Taylor RW, Turnbull DM, McFarland R (2015) Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of Neurology*, 77, 753-759
- Gray MW (2012) Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, a011403
- Graziewicz MA, Bienstock RJ, Copeland WC (2007) The DNA polymerase gamma Y955C disease variant associated with PEO and parkinsonism mediates the incorporation and translesion synthesis opposite 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Human Molecular Genetics*, 16, 2729-2739
- Greaves LC, Elson JL, Nooteboom M, Grady JP, Taylor GA, Taylor RW, Mathers JC, Kirkwood TBL, Turnbull DM (2012) Comparison of mitochondrial mutation spectra in ageing human colonic epithelium and disease: absence of evidence for purifying selection in somatic mitochondrial DNA point mutations. *PLoS Genetics*, 8, e1003082
- Gregoire J, Van der Linden M (1997) Effects of age on forward and backward digit spans. *Aging Neuropsychology and Cognition*, 4, 140-149
- Grúz P, Shimizua M, Sugiyama K, Honmaa M (2017) Mutagenicity of ω -3 fatty acid peroxidation products in the Ames test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 819, 14-19

- Guaraldi G, Zona S, Alexopoulos N, Orlando G, Carli F, Ligabue G, Fiocchi F, Lattanzi A, Rossi R, Modena MG, Esposito R, Palella F, Raggi P (2009) Coronary aging in HIV-infected patients. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1756-1762
- Guttman CR, Jolesz FA, Kikinis R, Killiany RJ, Moss MB, Sandor T, Albert MS (1998) White matter changes with normal aging. *Neurology*, 50(4), 972-978
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 13, 54-63
- Halliwell B, Chirico S (1993) Lipid-peroxidation - its mechanism, measurement and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715-725
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*, 3. Edition
- Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 10469-10474
- Harley CB (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic bomb? *Mutation Research*, 256, 271-282
- Harley CB, Homayoun V, Counter CM, Allsopp RC (1992) The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental Gerontology*, 27, 375-382
- Harman D (1956) Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journals of Gerontology*, 11, 298-300
- Harman D (1972) The biologic clock - the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20, 145-147
- Harris JJ, Jovilet R, Attwell D (2012) Synaptic energy use and supply. *Neuron*, 75, 762-777
- Harrison D (2011) Gerontology: mechanisms of aging. Lifespan as a biomarker. *The Jackson Laboratory*
- Hatefi Y (1985) The mitochondrial electron-transport and oxidative-phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 1015-1069
- Haug H, Eggers R (1991) Morphometry of the human cortex cerebri and corpus striatum during aging. *Neurobiology and Aging*, 12, 336-338
- Haut S, Brivet M, Touati G, Rustin P, Lebon S, Garcia-Cazorla A, Saudubray JM, Boutron A, Legrand A, Slama A (2003) A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Human Genetics*, 113, 118-122

- Hayflick L, Moorhead PS (1961) Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621
- Hayflick L (1965). Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research*, 37, 614-636
- Hedden T, Gabrieli JDE (2004) Insights into the aging mind: a view from cognitive neuroscience. *Nature Reviews*, 5, 87-97
- Hirose M, Schilf P, Lange F, Mayer J, Reichart G, Maity P, Jöhren O, Schwaninger M, Scharffetter-Kochanek K, Sina C, Sadik CD, Köhling R, Miroux B, Ibrahim SM (2016) Uncoupling protein 2 protects mice from aging. *Mitochondrion*, 30, 42–50
- Hirose M, Schilf P, Gupta Y, Zarse K, Künstner A, Fähnrich A, Busch H, Yin J, Wright MN, Ziegler A, Vallier M, Belheouane M, Baines JF, Tautz D, Oelkrug KJR, Mittag J, Lehnert H, Othman A, Jöhren O, Schwaninger M, Prehn C, Adamski J, Shima K, Rupp J, Häsler R, Fuellen G, Köhling R, Ristow M, Ibrahim SM (2018) Low-level mitochondrial heteroplasmy modulates DNA replication, glucose metabolism and lifespan in mice. *Scientific Reports*, 8, 5872
- Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Walker JE (2003) The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1604, 135-150
- Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121-130
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331, 717-719
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *American Journal of Human Genetics*, 46, 428-433
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421, 182-187
- Hughes BG, Hekimi S (2011) A mild impairment of mitochondrial electron transport has sex-specific effects on lifespan and aging in mice. *PLoS ONE*, 6, e26116
- Huttemann M, Klewer S, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Liu J, Lee M, Doan JW, Larson D, Slack E, Maghsoodi B, Erickson RP, Grossman LI (2012) Mice deleted for heart-type cytochrome c oxidase subunit 7a1 develop dilated cardiomyopathy. *Mitochondrion*, 12, 294-304
- Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD (2010) Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry: Mitochondrial Function*, 47, 53-67
- Johnson D, Allman E, Nehrke K (2012) Regulation of acid-base transporters by reactive oxygen species following mitochondrial fragmentation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 302, 1045-1054

- Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans LG, van den Brand MA, Janssen AJ, Diepstra JH, van den Brandt FC, van den Heuvel LP, Hol FA, Hofste TG, Kapusta L, Dillmann U, Shamdeen MG, Smeitink JA, Rodenburg RJ (2008) A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *Journal of Medical Genetics*, 45, 129-133
- Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT (2012) Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35, 211-225
- Kappeler L, De Magalhaes Filho CM, Dupont J, Leneuve P, Cervera P, Perin L, Loudes C, Blaise A, Klein R, Epelbaum J, Le Bouc Y, Holzenberger M (2008) Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biology*, 6, e254
- Kauppila JHK, Stewart JB (2015) Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847, 1354-1361
- Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson NG (2017) Mammalian mitochondria and aging: an update. *Cell Metabolism*, 25, 57-71
- Kazachkova N, Ramos A, Santos C, Lima M (2013) Mitochondrial DNA damage patterns and aging: revising the evidences for humans and mice. *Aging and Disease*, 4, 337-350
- Kazak L, Reyes A, Holt IJ (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 659-671
- Ke BX, Pepe S, Grubb DR, Komen JC, Laskowski A, Rodda FA, Hardman BM, Pitt JJ, Ryan MT, Lazarou M, Koleff J, Cheung MM, Smolich JJ, Thorburn DR (2012) Tissue-specific splicing of an Ndufs6 gene-trap insertion generates a mitochondrial complex I deficiency-specific cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6165-6170
- Keightley JA, Anitori R, Burton MD, Quan F, Buist NR, Kennaway NG (2000) Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *American Journal of Human Genetics*, 67, 1400-1410
- Keisari Y, Braun L, Flescher E (1983) The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology*, 165, 78-89
- Kennedy SR, Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA (2013) Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage. *PLoS Genetics*, 9, e1003794
- Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S (2009) Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 45, 31052-31061
- Kirchner S, Ignatova Z (2015) Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16, 98-112

- Kirkwood TBL (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120, 437-447
- Kitzman DW, Groban L (2011) Exercise intolerance. *Cardiology Clinics*, 29, 461-477
- Knapp LT, Klann E (2002) Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *Journal of Neuroscience Research*, 70, 1-7
- Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S (1990) A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochemical Biophysical Research Communications*, 173, 816-822, DOI:10.1016/S0006-291X(05)80860-5
- Koch C (2011) Untersuchung der Auswirkungen der mitochondrialen Atp-8-Mutation im conplastischen FVB-Mausmodell auf Pathogenesemechanismen des Diabetes mellitus. *Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin der medizinischen Fakultät der Universität Rostock*, urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0109-0
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2002) A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 118-122
- Kruse SE, Watt WC, Marcinek DJ, Kapur RP, Schenkman KA, Palmiter RD (2008) Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metabolism*, 7, 312-320
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 309, 481-484
- Kumar A (2011) Long-term potentiation at CA3-CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease and stress. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 3, 7
- Kuwajima M, Goto M, Kurane K, Shimbo H, Omika N, Jimbo EF, Muramatsu K, Tajika M, Shimura M, Murayama K, Kurosawa K, Yamagata T, Osaka H (2019) MELAS syndrome with m.4450 G > A mutation in mitochondrial tRNAMet gene. *Brain and Development*, 41, 465-469
- Lagouge M, Larsson NG (2013) The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of Internal Medicine*, 273, 529-543
- Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfors A, Andersen O, Wahlström J, Aasly J (1992) Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA(Lys)A-G(8344) mutation of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 51, 1201-1212
- Larsson NG (2010) Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annual Reviews Biochemistry*, 79, 683-706

- Latorre-Pellicer A, Moreno-Loshuertos RM, Lechuga-Vieco AV, Sánchez-Cobo F, Torroja C, Acín-Pérez R, Calvo E, Aix E, González-Guerra A; Logan A, Bernad-Miana ML, Romanos E, Cruz R, Cogliati S, Sobrino B, Carracedo A, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Ruíz-Cabello J, Murphy MP, Flores I, Vázquez J, Enríquez JA (2016) Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing. *Nature*, 535, 561-565
- Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR, Ryan MT (2007) Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 4228-4237
- Leary SC, Sasarman F, Nishimura T, Shoubridge EA (2009) Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Human Molecular Genetics*, 18, 2230-2240
- Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E (2002) The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biology*, 3, reviews 3015.1-9
- Lee I, Huttemann M, Liu J, Grossman LI, Malek MH (2012) Deletion of heart-type cytochrome c oxidase subunit 7a1 impairs skeletal muscle angiogenesis and oxidative phosphorylation. *Journal of Physiology*, 590, 5231-5243
- Lehmann D, Schubert K, Joshi PR, Baty K, Blakely EL; Zierz S, Taylor RW, Deschauer M (2015) A novel m.7539C>T point mutation in the mt-tRNA^{Asp} gene associated with multisystemic mitochondrial disease. *Neuromuscular Disorders*, 25, 81-84
- Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, Bao Y, Ho YS, Reddi AR, Holmgren A, Arnér ESJ (2016) Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiological Reviews*, 96, 307-364
- Leveen P, Kotarsky H, Morgelin M, Karikoski R, Elmer E, Fellmann V (2011) The GRACILE mutation induced into Bcs11 causes postnatal complex III deficiency: a viriable mouse model for mitochondrial hepatopathy. *Hepatology*, 53, 437-447
- Lewis KN, Andziak B, Yang T, Buffenstein R (2013) The naked molarat response to oxidative stress: just deal with it. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19, 1388-1399
- Lim AZ, Blakely EL, Baty K, He L, Hopton S, Falkous G, McWilliam K, Cozens A, McFarland R, Taylor RW (2019) A novel pathogenic m.4412G>A MT-TM mitochondrial DNA variant associated with childhood-onset seizures, myopathy and bilateral basal ganglia changes. *Mitochondrion*, 47, 18-23
- Lin CS, Sharpley MS, Fan W, Waymire KG, Sadun AA, Carelli V, Ross-Cisneros FN, Baciú P, Sung E, McManus MJ, Pan BX, Gil DW, Macgregor GR, Wallace DC (2012) Mouse mtDNA mutant model of Leber hereditary optic neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 20065-20070
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-715

- Lodato S, Arlotta P (2015) Generating neural diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, 31, 699-720
- Lombardi A, Silvestri E, Cioffi F, Senese R, Lanni A, Goglia F, de Lange P, Moreno M (2009) Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D-and Blue native-PAGE approach. *Journal of Proteomics*, 72, 708-721
- Los M, Dröge W, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K (1995) Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *European Journal of Immunology*, 25, 159-165
- Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown S, Chen SM, Chien Y, Hwu W, Fan P, Wong L, Atwal PS, Huang T (2018) Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 13039-13044
- Mailloux RJ, Harper ME (2011) Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 1106-1115
- Margulis L (1970) Origin of eukaryotic cells. *New Haven (Connecticut): Yale University Press*, 349
- Mattiasson G, Sullivan PG (2006) The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8, 1-38
- Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF (1993) Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Annals of Neurology*, 34, 609-616
- Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93, 421-443
- Mishra P, Chan DC (2016) Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 212, 379-387
- Molavi B, Mehta JL (2004) Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection and therapeutic considerations. *Current Opinion Cardiology*, 19, 488-493
- Morel F, Doussiere J, Vignais PV (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic-cells - physiological, molecular and pathological aspects. *European Journal of Biochemistry*, 201, 523-546
- Moreno-Loshuertos R, Ferrín G, Acín-Pérez R, Gallardo ME, Viscomi C, Pérez-Martos A, Zeviani M, Fernández-Silva P, Enríquez JA (2011) Evolution Meets Disease: Penetrance and Functional Epistasis of Mitochondrial tRNA Mutations. *PLOS Genetics*, 7, e1001379
- Morgan-Hughes JA, Schapira AHV, Cooper JM & Clark JB (1988) Molecular defects of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in mitochondrial diseases. *Journal of Bioenergy and Biomembranes*, 20, 365-382

- Morris R (1984) Developments of a Water-Maze procedure for studying spatial-learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47-60
- Mosconi L, De Santi S, Li J, Tsui WH, Li Y, Boppana M, Laska E, Rusinek H, de Leon MJ (2008) Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiology and Aging*, 29, 676-692
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Haskó G, Pacher P (2007) Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 203-208
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116, 201-211
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417, 1-13
- Nakamura J, Fujikawa M, Yoshida M (2013) IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Bioscience Reports*, 2013, 33
- NegreSalvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L (1997) Role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb Journal*, 11, 809-815
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, 13, 9-22
- Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, Walter P (1997) Mitochondrial transmission during mating *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular Biology of the Cell*, 8, 1233-1242
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. New York: Oxford University Press
- Osborn LM, Kamphuis W, Wadmana WJ, Hol EM (2016) Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 144, 121-141
- O'Sullivan M, Jones DK, Summers PE, Morris RG, Williams SC, Markus HS (2001) Evidence for cortical "disconnection" as a mechanism of age-related cognitive decline. *Neurology*, 57, 152-162
- Owusu-Ansah E, Song W, Perrimon N (2013) Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell*, 155, 699-712
- dePablo Y, Nilsson M, Pekna M, Pekny M (2013) Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Histochemistry and Cell Biology*, 140, 81-91

- Park DC, Smith AD, Lautenschlager G, Earles JL, Frieske D, Zwahr M, Gaines CL (1996) Mediators of long-term memory performance across the life span. *Psychology and Aging*, 11, 621-637
- Park DC, Lautenschlager G, Hedden T, Davidson NS, Smith AD, Smith PK (2002) Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. *Psychology and Aging*, 17(2), 299-320
- Park DC, Reuter-Lorenz P (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annual Reviews Psychology*, 60, 173-196
- Payne BAI, Wilson IJ, Hateley CA, Horvath R, Santibanez-Koref M, Samuels DC, Pride DA, Chinnery PF (2011) Mitochondrial aging is accelerated by anti-retroviral therapy through the clonal expansion of mtDNA mutations. *Nature Genetics*, 43, 806-810
- Pearl R (1928) *The Rate of Living, Being an Account of Some Experimental Studies on the Biology of Life Duration*. New York, Alfred A. Knopf
- Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological Reviews*, 94, 1077-1098
- Peralta S, Torraco A, Wenz T, Garcia S, Diaz F, Moraes CT (2013) Partial complex I deficiency due to the CNS conditional ablation of Ndufa5 results in a mild chronic encephalopathy but no increase in oxidative damage. *Human Molecular Genetics*, 23, 1399-1412
- Pereira L, Soares P, Maximo V, Samuels DC (2012) Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncogenic phenotype: pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors. *BMC Cancer*, 12, 53
- Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A (2009) Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790, 1005-1014
- Pullman ME, Monroy GC (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 238, 3762-3769
- Quarrie JK, Riabowol KT (2004) Murine models of life span extension. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2004, re5
- Radford NB, Wan B, Richmann A, Szczepaniak LS, Li JL, Li K, Pfeiffer K, Schagger H, Garry DJ, Moreadith RW (2002) Cardiac dysfunction in mice lacking cytochrome-c oxidase subunit VIaH. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology*, 282, 726-733
- Ragan CI (1990) Structure and function of an archetypal respiratory chain complex: NADH-ubiquinone reductase. *Biochemical Society Transactions*, 18, 515-516
- Rak M, Bénit P, Chrétien D, Bouchereau J, Schiff M, El-Khoury R, Tzagoloff A, Rustin P (2016) Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clinical Science (London)*, 130(6), 393-407

- Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 10190-10195
- Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA (2014) Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell*, 156, 825-835
- Raz N, Rodrigue KM, Kennedy KM, Head D, Gunning-Dixon F, Acker JD (2003) Differential aging of the human striatum: longitudinal evidence. *American Journal of Neuroradiology*, 24(9), 1849-1856
- Raz N, Gunning-Dixon F, Head D, Rodrigue KM, Williamson A, Acker JD (2004) Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume. *Neurobiology and Aging*, 25(3), 377-396
- Raz N, Rodrigue km; Head D, Kennedy KM, Acker JD (2004b) Differential aging of the meial temporal lobe: a study of a five-year change. *Neurology*, 62(3), 433-438
- Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C (2003) Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *Journal of Neuroscience*, 23, 3295-3301
- Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear-DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 6465-6467
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 8665-8670
- Ristow M, Zarse K (2010) How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology*, 45, 410-418
- Ristow M, Schmeisser K (2014) Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS). *Dose-Response*, 12, 288-341
- Ristow M (2014) Unrevealing the truth about antioxidants: Mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nature Medicine*, 20, 709-711
- Roberts LJ, Reckelhoff JF (2001) Measurement of F(2)-isoprostanes unveils profound oxidative stress in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287, 254-256
- Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15038-15043

- Roos S, Darin N, Kollberg G, Andersson Grönlund M, Tulinius M, Holme E, Moslemi AR, Oldfors A (2013) A novel mitochondrial tRNA Arg mutation resulting in an anticodon swap in a patient with mitochondrial encephalomyopathy. *European Journal of Human Genetics*, 21, 571-573
- Rose G, Crocco P, De Rango F, Montesanto A, Passarino G (2011) Further support to the uncoupling-to-survive theory: the genetic variation of human UCP genes is associated with longevity. *PLoS One*, 6, e29650
- Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, Ricquier D (2004) The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 53, 130-135
- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochemical Journal*, 370, 751-762
- Rubner M (1908) Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zum Wachstum und Ernährung. *München, Oldenbourg*
- Sachadyn P, Zhang XM, Clark LD, Naviaux RK, Heber-Katz E (2008) Naturally occurring mitochondrial DNA heteroplasmy in the MRL mouse. *Mitochondrion*, 8, 358-366
- Salmeen A, Barford D (2005) Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, 560-577
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283, 1488-1493
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT (1992) pp125fak a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 5192-5196
- Schauer M, Kottek T, Schönherr M, Bhattacharya A, Ibrahim SM, Hirose M, Köhling R, Fuellen G, Schmitz U, Kunz M (2015) A mutation in the NADH-dehydrogenase subunit 2 suppresses fibroblast aging. *Oncotarget*, 6, 8552-8566
- Schieber M, Chandel NS (2014) TOR signaling couples oxygen sensing to lifespan in *C. elegans*. *Cell Reports*, 9, 9-15
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M (2012) Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews Genetic*, 13, 878-890
- Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* lifespan by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metabolism*, 6, 280-293
- Scialo F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A (2017) Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*, 8, Article 428

- Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48, 158-167
- Serrano F, Klann E (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Research Reviews*, 3, 431-443
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 10771-10778
- Shirley R, Ord EN, Work LM (2014) Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke. *Antioxidants*, 3(3), 472-501
- Shoffner J, Lott M, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC (1990) Myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease (MERRF) is associated with mitochondrial DNA tRNALys mutation. *Cell*, 61, 931-937, DOI:10.1016/0092-8674(90)90059-N
- Siems WG, Grune T, Esterbauer H (1995) 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Science*, 57, 785-789
- Simon-Areces J, Dietrich MO, Hermes G, Garcia-Segura LM, Arevalo MA, Horvath TL (2012) Ucp2 induced by natural birth regulates neuronal differentiation of the hippocampus and related adult behavior. *PLoS ONE*, 7, e42911
- Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Barrio JR, Phelps ME (2000) Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6037-6042
- Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Reviews Genetic*, 2, 342-352
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32, 638-647
- Sohl CD, Szymanski MR, Mislak AC, Shumate CK, Amiralaie S, Schinazi RF, Anderson KS, Yin YW (2015) Probing the structural and molecular basis of nucleotide selectivity by human mitochondrial DNA polymerase γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 8596-8601
- Song Z, Laleve A, Vallières C, McGeehan JE, Lloyd R, Meunier B (2016) Human mitochondrial cytochrome b variants studied in yeast: not all are silent polymorphisms. *Human Mutation*, 37, 933-941
- Spittau B (2017) Aging microglia - phenotypes, functions and implications for age-related neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neurosciences*, 9, article 194

- Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science*, 257, 1220-1224
- Stadtman ER (2004) Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1105-1112
- Stadtman ER (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40, 1250-1258
- Stahon KE, Bastian C, Griffith S, Kidd GJ, Brunet S, Baltan S (2016) Age-related changes in axonal and mitochondrial ultrastructure and function in white matter. *Journal of Neuroscience*, 36, 9990-10001
- Stewart JB, Chinnery PF (2015) The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16, 530-542
- Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286, 1700-1705
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature Neuroscience*, 1, 366-373
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochemical Journal*, 318 (2), 379-382
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144, 810-823
- Szilard L(1959) On the nature of aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45, 35-45
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura K (2002) Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Experimental Gerontology*, 37, 523-531
- Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 6, 389-402
- Terry RD (2000) Cell death or synaptic loss in Alzheimers disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 59, 1118-1119
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, 1005-1028
- Torraco A, Peralta S, Iommarini L, Diaz F (2015) Mitochondrial diseases part I: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects on respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion*, 0, 76-91

- Torres AG, Buttle E, de Pouplana LR (2014) Roles of tRNA modifications in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 20, 306-314
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429, 417-423
- Trifunovic A, Larsson NG (2008) Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *Journal of Internal Medicine*, 263, 167-178
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552, 335-344
- UniProt* (2017) <http://www.uniprot.org>
- Uusimaa J, Finnilä S, Remes AM, Rantala H, Vainionpää L, Hassinen IE, Majamaa K (2004) Molecular epidemiology of childhood mitochondrial encephalomyopathies in a Finnish population: Sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNA(Arg), tRNA(Glu) and tRNA(Leu(UUR)) genes. *Pediatrics*, 114, 443-350
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84
- Vaupel JW (2010) Biodemography of human ageing. *Nature*, 464, 536-542
- Voet DJ, Voet JG, Pratt CW (2013) *Mitochondrial ATP synthesis. Fundamentals of Biochemistry, 4th ed., Wiley, Chapter 18, 581–620*
- Vogel G (2000) In Contrast to Dolly, Cloning Resets Telomere Clock in Cattle. *Science*, 288, 586-587
- Vorhees CV, Williams MT (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848-858
- Voza A, Parisi G, De Leonardis F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, Marmo R, Calcagnile VM, Palmieri L, Ricquier D, Paradies E, Scarcia P, Palmieri F, Bouillaud F, Fiermonte G (2014) UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 960-965
- Walker JE, Collinson IR, Van Raaij MJ, Runswick MJ (1995) Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *Methods in Enzymology*, 260, 163-190
- Walker JE (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*, 41, 1-16

- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242, 1427-1430
- Wanrooij S, Miralles Fusté J, Stewart JB, Wanrooij PH, Samuelsson T, Larsson NG, Gustafsson CM, Falkenberg M (2012) In vivo mutagenesis reveals that OriL is essential for mitochondrial DNA replication. *EMBO Reports*, 13, 1130-1137
- Wei W, Pagnamenta AT, Gleadall N, Sanchis-Juan A, Stephens J, Broxholme J, Tuna S, Odhams CA, Genomics England Research Consortium, NIHR BioResource, Fratter C, Turro E, Caulfield MJ, Taylor JC, Rahman S, Chinnery PF (2020) Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nature Communications*, 11, 1740
- Weiss H, Wester-Rosenloef L, Koch C, Koch F, Baltrusch S, Tiedge M, Ibrahim SM (2012) The mitochondrial Atp8 mutation induces mitochondrial ROS generation, secretory dysfunction, and beta-cell mass adaptation in conplastic B6-mtFVB mice. *Endocrinology*, 153, 4666-4676
- West RL (1996) An application of prefrontal cortex function theory to cognitive aging. *Psychological Bulletin*, 120, 272-292
- Wilde O (1890) The picture of Dorian Gray. Übersetzt von Hedwig Lachmann; Das Bildnis des Dorian Gray: Illustrierte Ausgabe. Jazzybee Verlag, 2015, Seite 23
- Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution*, 11, 398-411
- Williams SL, Taanman JW, Hansikova H, Houst'kova H, Chowdhury S, Zeman J, Houstek J (2001) A novel mutation in SURF1 causes skipping of exon 8 in a patient with cytochrome c oxidase-deficient leigh syndrome and hypertrichosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 73, 340-343
- Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286
- Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V (2016) Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857, 902-914
- Xu S, Chisholm AD (2014) *C. elegans* epidermal wounding induces a mitochondrial ROS burst that promotes wound repair. *Developmental Cell*, 31, 48-60
- Yang H, Brosel S, Acin-Pérez R, Slavkovich V, Nishino I, Khan R, Goldberg IJ, Graziano J, Manfredi G, Schon EA (2010) Analysis of mouse models of cytochrome c oxidase deficiency owing to Yang W, Hekimi S (2010) A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*, 8, e1000556
- Yanker BA, Lu T, Loerch P (2008) The aging brain. Annual Reviews Pathology, 3, 41-66 mutations in SCO2. *Human Molecular Genetics*, 19, 170-180

- Yarham JW, Elson JL, Blakely EL, McFarland R, Taylor RW (2010) Mitochondrial tRNA mutations and disease. *WIREs RNA* 1, 304-324
- Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y (2008) Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, 79, 341-351
- Yu X, Gimsa U, Wester-Rosenloef L, Kanitz E, Otten W, Kunz M, Ibrahim SM (2009) Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Research*, 19, 159-165
- Yu X, Wester-Rosenloef L, Gimsa U, Holzhueter SA, Marques A, Jonas L, Hagenow K, Kunz M, Nizze H, Tiedge M, Holmdahl R, Ibrahim SM (2009b) The mtDNA nt7778 G/T polymorphism affects autoimmune diseases and reproductive performance in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 18, 4689-4698
- Yuan R, Tsaih SW, Petkova SB, Marin de Evsikova C, Xing S, Marion MA, Bogue MA, Mills KD, Peters LL, Bult CJ, Rosen CJ, Sundberg JP, Harrison DE, Churchill GA, Paigen B (2009) Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. *Aging Cell*, 8, 277-287
- Yun J, Finkel T (2014) Mitohormesis. *Cell Metabolism*, 19, 757-766
- Zahn JM, Poosala S, Owen AB, Ingram DK, Lustig A, Carter A, Weeraratna AT, Taub DD, Gorospe M, Mazan-Mamczarz K, Lakatta EG, Boheler KR, Xu X, Mattson MP, Falco G, Ko MS, Schlessinger D, Firman J, Kummerfeld SK, Wood WH 3rd, Zonderman AB, Kim SK, Becker KG (2007) AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS Genetics*, 3(11), e201
- Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, 105(6), 745-55
- Zhang S, Wu M, Peng C, Zhao G, Gu R (2017) GFAP expression in injured astrocytes in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, 1905-1908
- Zheng W, Khrapko K, Coller HA, Thilly WG, Copeland WC (2006) Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase γ -mediated errors. *Mutation Research*, 599, 11-20
- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C (2007) Mitochondrial tRNA mutations – clinical and functional perturbations. *RNA Biology*, 4, 38-66
- Zou X, Ratti BA, O'Brien JG, Lautenschlager SO, Gius DR, Bonini MG, Zhu Y (2017) Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, DOI 10.1007/s10863-017-9718-8

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	<u>A</u> denosindiphosphat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
bp	<u>B</u> asenpaare
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CA	<u>C</u> ornu <u>A</u> mmonis
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidin-2-phenylindol
DG	<u>D</u> entate gyrus = <u>G</u> yrus <u>d</u> entatus
DNA	<u>D</u> eoxy <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid = DNS <u>D</u> eoxy <u>r</u> ibonukleinsäure
e ⁻	Elektron
FAD ⁺	<u>F</u> lavin- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
FADH ₂	Reduzierte Form von FAD ⁺
Fe ²⁺ / Fe ³⁺	Zweiwertiges beziehungsweise dreiwertiges Eisenion
FMN	<u>F</u> lavin- <u>M</u> ono <u>n</u> ukleotid
GPx	<u>G</u> luthation- <u>P</u> eroxi <u>d</u> ase
GFAP	<u>G</u> lial <u>f</u> ibrillary <u>a</u> cidic protein = saures Gliafaserprotein
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	<u>H</u> umanes <u>I</u> mmundefizienz- <u>V</u> irus
k	<u>k</u> ilo
m	<u>m</u> illi
M	<u>m</u> olar = mol / l
MELAS	<u>M</u> itochondrial <u>e</u> ncephalomyopathy, <u>l</u> actic <u>a</u> cidosis, <u>s</u> troke-like episodes
MERRF	<u>M</u> yo <u>c</u> lonic <u>e</u> pilepsy with <u>r</u> agged <u>r</u> ed <u>f</u> ibers
MFI	<u>M</u> ean <u>f</u> lourescence <u>i</u> ntensity = <u>m</u> ittlere <u>F</u> luoreszenz <u>i</u> ntensität
MtDNA	<u>M</u> itochondriale DNA

MWM	<u>M</u> orris <u>W</u> ater <u>M</u> aze
n	Anzahl der Elemente in der Stichprobe
NAD ⁺	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
NADH	Reduzierte Form von NAD ⁺
NeuN	<u>N</u> euro <u>N</u> <u>N</u> uclei
NGS	<u>N</u> ormal <u>g</u> oat <u>s</u> erum
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH [·]	Hydroxylradikal
p	<i>probabilitas</i> (= Wahrscheinlichkeit) = Signifikanzwert
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEO	<u>P</u> rogressive <u>e</u> xternal <u>o</u> phthalmoplegia
POL _γ	Mitochondriale DNA-Polymerase
Prx	<u>P</u> eroxi <u>r</u> edox <u>i</u> n
RNA	<u>R</u> ibonucleic acid = RNS <u>R</u> ibonucleinsäure
tRNA	<u>T</u> ransfer-RNA
rRNA	<u>R</u> ibosomale RNA
ROS	<u>R</u> eactive <u>o</u> xgen <u>s</u> pecies = reaktive Sauerstoffspezies
SNP	<u>S</u> ingle <u>n</u> ucleotide polymorphism = Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOD	<u>S</u> uperoxid- <u>D</u> ismutase
TRIS	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCP	<u>U</u> ncoupling protein = entkoppelndes Protein
V	<u>V</u> olt
ZNS	<u>Z</u> entral <u>n</u> ervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

E1	Mittlere Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland.	2
E2	Die mitochondriale DNA besteht aus einem circulären doppelsträngigen Molekül und ist bei Säugetieren etwa 16 kbp groß.	5
E3	Die mitochondriale Atmungskette.	6
E4	Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und deren Umwandlung in Mitochondrien.	8
E5	Die Rolle von ROS im Konzept der Mitohormesis.	11
E6	Klonale Expansion von mutierten mtDNA Molekülen führt erst nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes zu mitochondrialer Dysfunktion.	14
E7	Altersbedingte kognitive Funktionsbeeinträchtigungen als Ergebnis neuroanatomischer Veränderungen ausgelöst durch einen verminderten Energiemetabolismus.	17
<hr/>		
M1	Repräsentative Altersangaben für Lebenszeitpunkte von C57BL/6J Mäusen im Vergleich zu Menschen.	21
M2	Schematische Darstellung zur Generierung von conplastischen Mäusen.	23
M3	Schematische Darstellung der mitochondrialen DNA mit farblicher Kennzeichnung der von einem SNP betroffenen Gen der conplastischen Versuchsstämme.	26
M4	Schematische Darstellung zum Ablauf der Lernversuche im Morris Water Maze.	33
<hr/>		
R1	Mitochondriales Superoxid der Kontrollstämme BL6 und mtAKR.	38
R2	Mitochondriales Superoxid im Hippocampus des Kontrollstammes BL6.	39
R3	Mitochondriales Superoxid im Hippocampus der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.	40
R4	Mitochondriales Superoxid im Hippocampus von 24-Monate alten Versuchstieren.	41
R5	Mitochondriales Superoxid im Neocortex der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.	42
R6	Mitochondriales Superoxid der Stämme UCP2 ^{-/-} und BL6.	43
R7	Mitochondriales Superoxid der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.	44
R8	Mitochondriales Superoxid im Neocortex von 24-Monate alten Versuchstieren.	45
R9	GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der Kontrollstämme.	46
R10	GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.	47
R11	GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der UCP2-Knockout-Mutante	49
R12	GFAP-zu-NeuN-Verhältnis im Hippocampus der Mausstämme mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.	50
R13	Ergebnisse der Kontrollstämme aus den Lernversuchen im MWM.	51
R14	Ergebnisse des mtALR-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.	53
R15	Ergebnisse des mt129S1-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.	54
R16	Ergebnisse des mtNOD-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.	55

R17	Ergebnisse des mtFVB-Stammes aus den Lernversuchen im MWM.	56
R18	Vergleich des prozentualen Anteils an Tieren mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette, welche den MWM Lernversuch komplett absolvierten.	57
R19	Ergebnisse der UCP2-Knockout-Mutante aus den Lernversuchen im MWM.	58
R20	Ergebnisse der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA aus den Lernversuchen im MWM.	60
R21	Vergleich der Tierzahlen mit absolviertem MWM Lernversuch der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.	61
R22	Überlebensanalyse der Kontrollstämmen.	62
R23	Überlebensanalyse der Mausstämmen mtALR, mt129S1, mtNOD und mtFVB.	63
R24	Überlebensanalyse der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette.	64
R25	Überlebensanalyse der UCP2-Knockout-Mutante.	65
R26	Überlebensanalyse der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA.	66

7.3 Tabellenverzeichnis

M1	Übersicht der verwendeten Mausstämmen	25
M2	Zusammensetzung der Präparations- und Messlösung	27
M3	Zusammensetzung des PBS-Puffers	29
M4	Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien	35
M5	Bezugsquellen der verwendeten Antikörper und Zellfarbstoffe	36
M6	Bezugsquellen der verwendeten Geräte, Materialien und Software	36

R1	Mittlere Lebenszeiten der untersuchten Mausstämmen	61
R2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette und der UCP2-Knockout-Mutante	67
R3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mausstämmen mit Veränderungen in der mitochondrial kodierten Arginin-spezifischen tRNA	68

7.4 Danksagung

Für die Themenvergabe und die konzeptionelle Begleitung danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling vom Oscar Langendorff Institut für Physiologie. Seine sachkundige erfahrene Betreuung war stets hilfreich und seine anspruchsvollen und interessanten Hinweise haben diese Arbeit bereichert.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Johannes Mayer und Herrn Dr. med. Tursonjan Tokai, die mit mir gemeinsam das ROSAge-Projekt am Oscar Langendorff Institut bearbeitet haben.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Simone Erika Baltrusch und Herrn Prof. Dr. med. Markus Tiedge vom Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die Möglichkeit, das konfokale Fluoreszenzmikroskop zur Messung der Superoxidgehalte nutzen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim und Frau Dr. rer. nat. Misa Hirose vom Institut für Experimentelle Dermatologie der Universität Lübeck danke ich für die Bereitstellung der conplastischen Mausstämmen sowie für die Unterstützung in Bezug auf Genetikfragen.

Allen Mitarbeitern des Oscar Langendorff Instituts, insbesondere meinen Kolleginnen Tina Sellmann und Katrin Porath, danke ich für die stets angenehme, kollegiale Atmosphäre und konstruktive Unterstützung. Auch den Mitarbeitern der Medizinischen Biochemie, allen voran Frau Dr. rer. nat. Julia Schulz und Frau Dr. rer. nat. Cindy Zehm, danke ich für das entgegenkommende und freundliche Miteinander.

7.5 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Gesine Reichart, die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung altersspezifischer Effekte von Polymorphismen der mitochondrialen DNA auf das murine Gehirn“ selbständig und nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe weder diese noch eine andere Arbeit zuvor an einer Hochschule als Dissertation eingereicht.

Rostock, Juni 2020

Gesine Reichart