

Disproportionalität der Aktivitäten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe  
im Myokard und in der Skelettmuskulatur im Alter

## Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Mike Tostlebe

geb. am 26. Mai 1971

in Finsterwalde

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Frau PD Dr. rer. nat. E. Schwarz
2. Herr Prof. Dr. rer. nat. H. Morawietz

Halle (Saale), den 06.07.2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008713**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008713>]

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 LEBEN HEIßT ALTERN .....	1
1.2 KLASSISCHE THEORIEN DES PRIMÄREN ALTERNS .....	1
1.3 DIE ROLLE DER MITOCHONDRIEN BEIM ALTERN .....	4
1.3.1 Gegenwärtige Hypothesen des mitochondrialen Alterns.....	6
1.3.2 Intramitochondriale antioxidative Schutzmechanismen .....	9
1.3.3 Prävention des (mitochondrialen) Alterns?.....	11
1.4 AUSWIRKUNGEN DES ALTERNS AUF DAS HERZ.....	12
1.5 AUFGABENSTELLUNG .....	15
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>16</b>
2.1 TIERISCHE GEWEBE .....	16
2.2 HUMANE GEWEBE.....	17
2.3 BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN .....	18
2.4 GERÄTE UND CHEMIKALIEN.....	18
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>20</b>
3.1 MIKRORESPIROMETRISCHE MESSUNGEN .....	20
3.1.1 skinned fiber-Technik zur Permeabilisierung der Muskelfasern .....	20
3.1.2 Aufarbeitung der Proben .....	20
3.1.3 Mikrorespirometrie.....	21
3.1.3.1 Prinzip der Atmungsmessungen .....	23
3.1.3.2 Mitochondriale Atmungsgeschwindigkeit und respiratorischer Kontrollindex .....	24
3.2 MESSUNGEN DER ENZYMAKTIVITÄT.....	25
3.2.1 Herstellung der Gewebehomogenate.....	25
3.2.2 Messung der Enzymaktivitäten .....	25
3.2.2.1 Komplex I .....	26
3.2.2.2 Komplex I + III .....	27
3.2.2.3 Komplex II + III.....	27
3.2.2.4 Komplex III.....	28
3.2.2.5 Cytochrom-c-Oxidase .....	28
3.2.2.6 Citratsynthase.....	28
3.2.2.7 Bestimmung von Nichtkollagen-Protein .....	29
3.3 ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	29
3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	29
3.3.1.1 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation.....	29

3.3.1.2	RNeasy® Kit (Qiagen).....	30
3.3.2	<i>Isolierung von Gesamt-DNA</i> .....	31
3.3.3	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	31
3.3.3.1	Kultivierung der Bakterien.....	31
3.3.3.2	Isolation von Plasmiden .....	31
3.4	STANDARDTECHNIKEN FÜR DAS ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN .....	32
3.4.1	<i>Bestimmung der Konzentration</i> .....	32
3.4.2	<i>Gelelektrophorese</i> .....	32
3.4.3	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i> .....	32
3.4.3.1	Elektroelution von DNA-Fragmenten .....	32
3.4.3.2	JETQUICK Gel Spin Kit.....	33
3.4.4	<i>Restriktionsansätze</i> .....	33
3.4.5	<i>Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</i> .....	33
3.4.5.1	RT-Ansatz.....	33
3.4.5.2	PCR-Ansatz.....	34
3.4.6	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> .....	35
3.4.7	<i>Automatische DNA-Sequenzierung</i> .....	35
3.5	KOMPETITIVE STANDARDKALIBRIERTE RT-PCR .....	36
3.5.1	<i>Herstellung des DNA-Standards</i> .....	37
3.5.1.1	Klonierung der Standard-DNA-Fragmente .....	39
3.5.1.2	Selektion positiver Klone.....	39
3.5.1.3	Berechnung der Molekülzahl der Standard-DNA-Fragmente .....	40
3.5.2	<i>Bestimmung der geeigneten Standardkonzentrationen für die kompetitive RT-PCR</i> .....	40
3.5.3	<i>Durchführung und Auswertung der standardkalibrierten RT-PCR</i> .....	40
3.6	SEMIQUANTITATIVE RT-PCR .....	41
3.7	SOUTHERN-BLOT-ANALYSEN .....	43
3.7.1	<i>Vorbereitung der Proben</i> .....	43
3.7.2	<i>Blotten</i> .....	44
3.7.3	<i>Hybridisierung</i> .....	44
3.7.4	<i>Waschen und Detektion</i> .....	45
3.8	STATISTISCHE VERFAHREN .....	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
4.1	MIKRORESPIROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	47
4.2	ENZYMAKTIVITÄTEN VON KOMPLEXEN DER ATMUNGSKETTE.....	53
4.2.1	<i>Messung der Enzymaktivitäten von Atmungskettenkomplexen im Myokard von Ratten</i> .....	53
4.2.2	<i>Messung der Enzymaktivitäten im M. soleus von Ratten</i> .....	57
4.2.3	<i>Bestimmung der Enzymaktivitäten in humanen linken Ventrikeln</i> .....	59
4.3	QUANTIFIZIERUNG MITOCHONDRIALER UND NUKLEÄRER TRANSKRIPTE .....	62
4.3.1	<i>Vergleich der mitochondrialen Transkripte im Myokard von jungen und alten Sprague-Dawley-Ratten</i> .....	66
4.3.2	<i>Vergleich der myokardialen mitochondrialen Transkripte in jungen und alten Fisher-Ratten nach</i>	

---

<i>L-NAME-Behandlung</i> .....	67
4.3.3 <i>Expressionsuntersuchungen der Transkripte an Fisher-Ratten nach Coenzym Q<sub>10</sub>-Behandlung</i> .	71
4.3.4 <i>Vergleich der mitochondrialen und nukleären Transkripte in humanen Myokardproben</i> .....	73
4.4     UNTERSUCHUNGEN DER MITOCHONDRIALEN DNA MITTELS SOUTHERN-BLOT-ANALYSEN .....	75
<b>5     DISKUSSION</b> .....	<b>78</b>
5.1     WIE VERHALTEN SICH DIE FUNKTIONELLEN PARAMETER DER MITOCHONDRIEN IM ALTER? .....	78
5.2     ÄNDERT SICH IM ALTER DIE EXPRESSION MITOCHONDRIAL CODIERTER GENE?.....	83
5.3     GIBT ES VERÄNDERUNGEN IN QUANTITÄT UND QUALITÄT DER MTDNA IM ALTER? .....	86
5.4     OFFENE FRAGEN UND ASPEKTE DES MITOCHONDRIALEN ALTERNS .....	89
5.5     SCHLUSSFOLGERUNG .....	93
<b>6     ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>96</b>
<b>7     LITERATUR</b> .....	<b>98</b>

## ANHANG

## Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon$	Molarer Extinktionsfaktor
A	Adenin
AGE	Advanced Glycation End Products
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ANT	Adenin-Nucleotid-Translokator
AS	Antisense
$A_x$	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	copy DNA
CI	cardiac index
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CS	Citratsynthase
CSPD	Disodium 3-(4-meth-oxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)phenyl phosphate
Cyt c	Cytochrom c
d	Tag/e
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2' Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxy-Uracil-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	ejection fraction
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
G	Guanin
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidinisoithiocyanat
hsDNA	Heringssperma-DNA
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI + III	Komplex I + III: NADH-Cytochrom-c-Reduktase
KII + III	Komplex II + III: Succinat-Cytochrom-c-Reduktase
KIII	Komplex III: Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase
KIII-RNO	KIII Related NADH+H <sup>+</sup> Oxidation
LB	Luria-Bertani
LDL	low density lipoprotein
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-argininmethylester
LV	linker Ventrikel

---

MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	messenger-RNA
mtRNA	mitochondriale RNA
mtTFA	mitochondrialer Transkriptionsfaktor
n.s.	nicht signifikant
NCP	Nichtkollagen-Protein
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
PRSR	Pyruvat Related Succinat Respiration
Q	Coenzym Q / Ubichinon
QH <sub>2</sub>	Ubichinol
RCI	Respiratorischer Kontrollkoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	RT mit anschließender PCR
S	Sense
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SOD	Superoxiddismutase
SRNO	Succinat Related NADH+H <sup>+</sup> Oxidation
SRPR	Succinat Related Pyruvat Respiration
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TSPE-Puffer	Tris-Sarcosyl-Phenol-EDTA-Puffer
U	Unit (Enzymeinheit)
UCP	uncoupling protein
VDAC	voltage dependent anion channel
Vol	Volumen
vs.	versus
w/v	Masse pro Volumen
ww	Feuchtgewicht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid

# 1 EINLEITUNG

When I get older losing my hair, many years from now.  
...  
Will you still need me, will you still feed me, when I'm sixty-four.

The Beatles

## 1.1 Leben heißt Altern

Ob am dreißigsten, am vierzigsten oder am fünfzigsten Geburtstag – irgendwann hört es jeder: das unerbittliche Ticken der biologischen Uhr – wir altern. Das Altern ist ein Prozess, der nicht erst in höherem Lebensalter beginnt, sondern von Geburt an unumkehrbar fortschreitet. Eine Vielzahl von Einflüssen bedingt, dass Lebewesen altern. Umweltfaktoren, der Lebensstil, wie auch einschneidende Lebensereignisse beschleunigen den genetisch vorherbestimmten Alterungsprozess.

Man unterscheidet zwei Formen des Alterns: das primäre Altern und das sekundäre Altern. Als primäres Altern bezeichnet man den Alterungsprozess von Zellen, Organen und Organismen in Abwesenheit von Krankheiten, der die maximale Lebensspanne definiert. Dieser Vorgang verläuft Spezies spezifisch und wird genetisch gesteuert. Prozesse des sekundären Alterns sind durch Krankheiten und entsprechende kompensatorische Anpassungen in Phänotyp und Funktion an akkumulierende Schäden und Funktionsstörungen gekennzeichnet. Die Forschung an experimentellen Modellorganismen (genetische Basis) untersucht somit das primäre Altern; die Geriatrie/Gerontologie befasst sich mit den Vorgängen des sekundären Alterns. Die am Gesamtorganismus erkennbaren Alterserscheinungen haben ihre Ursachen in vielfältigen Veränderungen auf zellulärer Ebene. So existieren unterschiedliche Theorien und Hypothesen, die das Zustandekommen dieser Veränderungen mehr oder weniger schlüssig erläutern.

## 1.2 Klassische Theorien des primären Alterns

(1) Die „*Rate Of Living*“ Hypothese des Alterns wurde zu Beginn des letzten Jahrhunderts durch vergleichende Beobachtungen aufgestellt. Demnach limitiert eine hohe Stoffwechselrate die maximale Lebensdauer eines Organismus, wogegen eine geringere Stoffwechselrate mit einer höheren Lebenserwartung verbunden ist (Rubner, 1908; Pearl, 1928). Abweichungen

von dieser empirischen Regel wurden dieser Hypothese als kritische Argumente entgegengehalten.

(2) Die „*Theorie der freien Radikale*“ des Alterns entwickelte sich aus Beobachtungen biologischer Effekte, die durch eine längere Bestrahlung ausgelöst wurden (Harman, 1956; Harman, 1972; Beckman *et al.*, 1998), sowie einer mit zunehmendem Alter daraus entstehenden Imbalance zwischen radikalbildenden und protektiven Mechanismen. Diese Theorie sieht in der Entstehung von freien Radikalen die Ursache für alle Alterungsprozesse, die von Umweltfaktoren und vom Genom modifiziert werden können. Demnach ist die Ansammlung der Schäden, die durch reaktive Oxidantien verursacht wurden, ausschlaggebend und limitierend für die verbleibende Lebensspanne.

(3) Das „*Hayflick-Konzept*“: Wie Hayflick *et al.*, 1961 zeigen konnten, sind Bindegewebszellen in Kultur nur in der Lage sich maximal 60 mal zu teilen, und zwar immer langsamer, bevor sie sterben – sie altern. Weil Hayflick seine Zelllinien immer wieder einfro, stellte er weiterhin fest, dass sie sich trotz ihres „Eisschlafes“ merken konnten, wie viele Teilungen vor dem Einfrieren erfolgten. Taute man die Zellen auf, so teilten sie sich nur noch exakt so viele Male, wie ihnen ohne den erzwungenen Schlaf geblieben wären – ein zellulärer Zählmechanismus (eine Art mitotische Uhr) war entdeckt. Das nach ihm benannte „Hayflick-Konzept“ beruht auf der Beobachtung, dass die Zelle bei jeder Teilung einen Teil ihrer Telomere (Endstücke der chromosomalen DNA mit einer großen Anzahl von Wiederholungen guaninreicher Oligonukleotidsequenzen) verliert, da für die Endstücke dieser DNA-Abschnitte kein Replikationsmechanismus existiert.

Diese ursprünglich voneinander unabhängigen Theorien wachsen jedoch immer weiter zusammen. In eukaryotischen Zellen ist die nichtenzymatische Bildung von Superoxidanionen durch die mitochondriale Atmungskette der Haupterzeuger reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; Tabelle 1-1) (Abbildung 1-1; Boveris *et al.*, 1973; Turrens, 1997). Das Konzept der *Atmungs-raten abhängigen mitochondrialen Radikalproduktion* verknüpft die „Rate Of Living“ Hypothese (atmungs-ratenabhängige mitochondriale Radikalbildung) mit der „Theorie der freien Radikale“ des Alterns. Sie beschreibt sowohl durch mitochondrial gebildete ROS auftretende Gewebeschäden, als auch degenerative Erscheinungen, die durch das Altern verursacht werden (Harman, 1972; Sohal, 1991; Ku *et al.*, 1993). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass einige Spezies eine wesentlich längere Lebensspanne haben, als ihre Stoffwechselrate erwarten lassen würde. Sie besitzen Mitochondrien, die unter definierten Bedingungen nur eine sehr geringe mitochondriale ROS Produktion zeigen (Ku *et al.*, 1993; Barja, 1999).

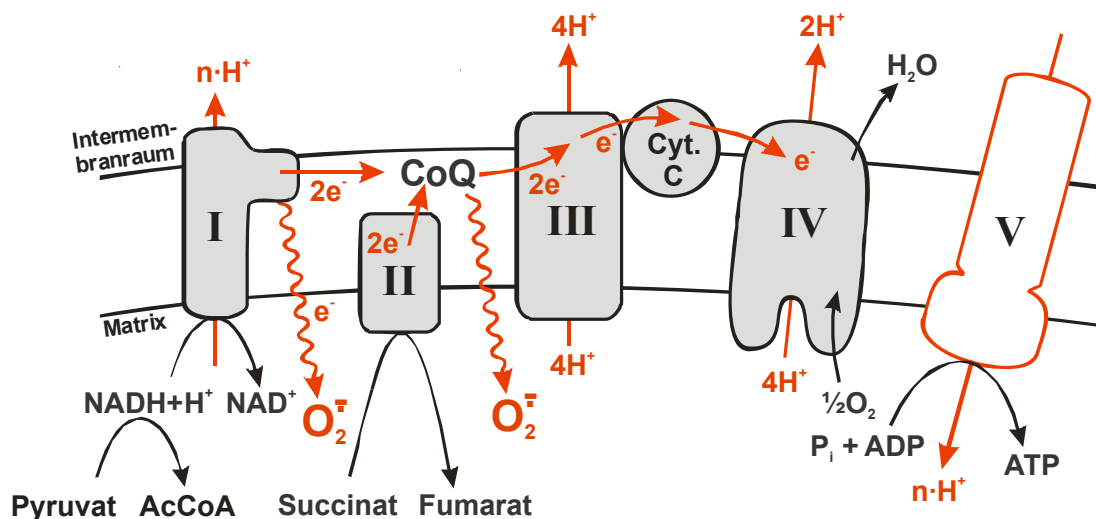


ROS	Name	Bemerkungen
$O_2^{\bullet -}$	Superoxid-Radikal	wird bei vielen Autooxidationsreaktionen gebildet
$HO_2^{\bullet}$	Perhydroxyl	protonierte Form von $O_2^{\bullet -}$
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid	Zwei-Elektronen-Reduktionszustand; häufig enzymatisch gebildet
$HO^{\bullet}$	Hydroxyl-Radikal	Drei-Elektronen-Reduktionszustand; Entstehung metallkatalysiert
$RO^{\bullet}$	R-Oxyl-Radikal	organisches Radikal; z.B. als Alkoxyradikal bei Lipidoxidation gebildet
$ROO^{\bullet}$	R-Dioxyl-Radikal	organisches Radikal; z.B. Alkyldioxyradikal bei Lipidoxidation gebildet
$ROOH$	R-Hydroperoxyd	Protonierte Form von Dioxyradikalen; z.B. Lipidperoxid

**Tabelle 1-1: Zusammenstellung biologisch reaktiver Sauerstoffspezies:** Diese reaktionsfähigen Radikale sind imstande, nahezu alle in lebenden Strukturen vorkommenden Verbindungen oxidativ zu verändern und damit funktionell schwer zu beeinträchtigen (Löffler *et al.*, 1998).

Diese lange diskutierten Abweichungen von der „Rate Of Living“ Hypothese halfen, eine auffallende Korrelation zwischen mitochondrialen Lecks (Elektronen entweichen aus der Atmungskette und bilden Superoxidanionen) und der Rate des primären Alterns zu finden (Perez-Campo *et al.*, 1998).

Die Bildung von Superoxidradikalen in den Mitochondrien erfolgt an Komplex I und Komplex III (Abbildung 1-1) in der Atmungskette (Ide *et al.*, 1999). Hauptstelle der ROS-Bildung ist der Elektronentransfer zwischen Coenzym Q und Komplex III (Turrens, 1997).



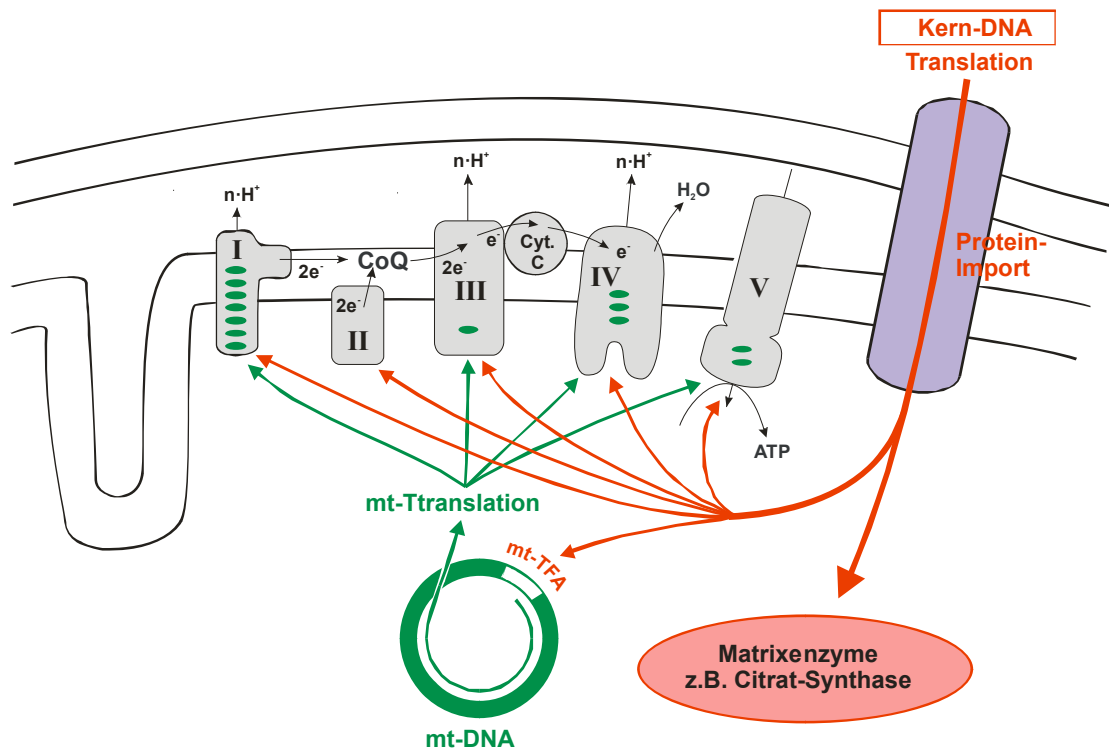
**Abbildung 1-1: Entstehung von ROS in der mitochondrialen Atmungskette:** Durch das Entweichen von Elektronen zwischen den einzelnen Komplexen der Atmungskette ist die Bildung von Superoxidanionen möglich.

Vom Semiquinon kann nichtenzymatisch ein Elektron zum molekularen Sauerstoff transferiert werden. Das erfolgt meistens dann, wenn der mitochondriale Protonengradient hoch ( $pO_2$  ist hoch) und die Halbwertszeit von Semiquinon aufgrund geringen Elektronentransports in der Atmungskette verlängert ist. Dafür kann geringer ATP-Verbrauch eine mögliche Ursache sein (Skulachev, 1996; Korshunov *et al.*, 1997). *In vitro*-Analysen an isolierten Mitochondrien zeigten eine Superoxidanionproduktion von ca. 1-2 % des aufgenommenen Sauerstoffs (Boveris *et al.*, 1973). Dieser Anteil wird unter normalen Bedingungen *in vivo* jedoch noch diskutiert.

### 1.3 Die Rolle der Mitochondrien beim Altern

In Säugetieren sind an der Bildung der fünf Komplexe der Atmungskette ca. 80 nukleäre Genprodukte direkt beteiligt (Komplex I: 43; Komplex II: 4; Komplex III: 10; Komplex IV: 10; Komplex V:  $\geq 10$ ) (Saraste, 1999; Wallace, 1999; Smeitink *et al.*, 2000). Lediglich 13 Proteinuntereinheiten werden durch das mitochondriale Genom codiert (Wallace, 1999). Für die Synthese der mitochondrial codierten Proteine ist wiederum der Import kerncodierter Proteinsignale notwendig (mitochondrialer Transkriptionsfaktor A: mtTFA, siehe Abbildung 1-2) (Larsson *et al.*, 1997).

In Säugerzellen kommt dem mtTFA eine zentrale Rolle bei der Koordination der Kern- und mtDNA-Expression zu (Shadel *et al.*, 1997; Moraes, 2001). Er bindet nach dem Import in die Mitochondrien an die mitochondriale DNA und ermöglicht zusammen mit anderen Faktoren den Start der Transkription, während in Hefe der zum mtTFA homologe Faktor Abf2p lediglich einen histonartigen mtDNA-Packungsfaktor darstellt (Lecrenier *et al.*, 2000). Da in Säugermitochondrien die Replikation an die Bildung von L-Strang-Transkripten gebunden ist, ist der mtTFA auch Voraussetzung für die Replikation der mitochondrialen DNA in Säugerzellen. Endgültig ist diese Funktion jedoch noch nicht geklärt, da z.T. eine sehr hohe Packungsdichte von mtTFA an der mitochondrialen DNA gefunden wurde (Takamatsu *et al.*, 2002; Kanki *et al.*, 2004), die eine regulatorische Funktion weniger wahrscheinlich macht und auf Hefe-analoge *packaging*-Funktionen hindeutet. Andererseits bewirkt eine erhöhte Konzentration von mtTFA durch *in vitro*-Import (Garstka *et al.*, 2003) oder durch Überexpression tatsächlich einen Anstieg der Transkriptionsrate und des mtDNA-Gehalts (Noack *et al.*, unveröffentlicht).



**Abbildung 1-2: Zusammensetzung der Komplexe der Atmungskette:** Der Aufbau der Atmungskettenkomplexe in den Mitochondrien erfolgt sowohl durch mitochondrial wie auch kerncodierte Proteinuntereinheiten. Die mitochondrial codierten Untereinheiten sowie deren Anzahl pro Komplex sind durch die grünen Symbole dargestellt.

Für die Translation des Codes der mitochondrialen DNA sind 2 mitochondriale rRNAs und 22 tRNAs notwendig, die ebenfalls mitochondrial codiert sind (Wallace, 1999). Alle weiteren Proteine, die für Aufbau, Funktion und Turnover dieser Organellen notwendig sind, sind kerncodiert.

Nach der Endosymbionten-Hypothese sind Chloroplasten und Mitochondrien Nachkommen einstmals selbständig lebender Bakterienzellen. Sie wurden von der Urform der Eukaryotenzelle phagozytotisch aufgenommen, aber nicht verdaut, sondern als Endosymbionten behalten, wobei sich die Mitochondrien aus frei lebenden atmenden Eubakterien entwickelten, während die Chloroplasten aus Vorläufern von Cyanobakterien hervorgegangen sind. Von ihrem ursprünglichen Genom haben Mitochondrien wie auch Chloroplasten nur noch einen Bruchteil erhalten. Im Laufe der Evolution wurde der größte Teil des Genoms in den Kern der Wirtszelle transferiert oder ging vollständig verloren. Um die Replikationsrate des mitochondrialen Genoms zu erhöhen und damit die Verteilung auf die beiden Tochterzellen zu gewährleisten wurde das mitochondriale Genom bei Säugern auf ca. 16.500 bp reduziert (Wallace, 1999). Bemerkenswert dabei ist, dass neben der Verschiebung des genetischen

Materials von Mitochondrien und Chloroplasten in den Kern noch codierende DNA in diesen Organellen verblieb (Race *et al.*, 1999). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Notwendigkeit, bestimmte kritische Proteine der Atmungskette nur dann und dort zu synthetisieren, wenn sie benötigt werden. Somit können ungewollte Nebeneffekte des bioenergetischen Elektronentransports vermieden werden, wie z.B. die Bildung von Radikalen durch Lecks in der Atmungskette (Allen, 1993). Voraussetzung dafür ist eine schnelle, stabile, kurze, einfache und redoxsensitive Signalkaskade für die Expressionskontrolle kritischer Komponenten der bioenergetischen Membran.

Ein Kernproblem dieser zellulären Symbiose ist somit der Umgang mit der potentiell gefährlichen radikalbildenden Atmungskette. Während einerseits die Ansammlung mitochondrialer Schäden als der entscheidende Motor des primären Alterns diskutiert wird (vgl. 1.2 und 1.3.1), sehen die Gegner dieser Theorie diese Ansammlung als ein Epiphänomen der Zellalterung, die durch andere Mechanismen gesteuert wird (Harding, 1992; Rustin *et al.*, 2000). Da viele Details noch nicht vollständig aufgeklärt sind, wird die Kontroverse zum mitochondrialen Altern noch eine Weile Bestand haben.

### 1.3.1 Gegenwärtige Hypothesen des mitochondrialen Alterns

Mitochondriales Altern diskutiert die Rolle der Mitochondrien bei der Bildung von Radikalen, welche die Alterungsrate beeinflussen (Harding, 1992; Rustin *et al.*, 2000). Mitochondrien unterliegen einer hohen Erneuerungsrate und haben eine nur auf wenige Wochen beschränkte Lebensdauer (Menzies *et al.*, 1971). Dieser Umstand stellt ein generelles Problem für jede Hypothese der mitochondrialen Radikalproduktion sowie der ursächlichen Mechanismen des primären Alterns dar. Diese Art der „Reparatur durch Austausch“ ist ein wichtiges Prinzip für die Korrektur der radikalinduzierten mitochondrialen Schäden (Beckman *et al.*, 1998). Material, welches einem ständigen Austausch unterliegt, kann aber in zunehmendem Alter nicht chronische Schäden akkumulieren (de Grey, 1997). Somit wurden Konzepte entwickelt, wonach während des mitochondrialen Turnover die verbliebenen Bausteine nicht vollständig abgebaut werden und in der Lage sind, die durch die mitochondriale Radikalproduktion hervorgerufenen Schäden zu akkumulieren. Diese Konzepte sind nicht zwangsläufig gegensätzlich, sie scheinen parallel zu koexistieren, wenngleich auch ihr Beitrag zum Prozess des Alterns im Allgemeinen unbekannt ist und abhängig von Zelltyp und Organ stark variiert.

(1) Die „*Mitochondrial-Lysosomal Axis*“ *Theorie des Alterns* sagt aus, dass oxidativ geschädigte Moleküle nicht immer vollständig degradiert werden können und sich in Lysoso-

men anreichern (Terman, 2001; Brunk *et al.*, 2002). In proliferierenden Zellen werden oxidativ geschädigte Moleküle und Organellen durch die Zellteilung und die anschließende Neusynthese effektiv verdünnt (Sheldrake, 1974). Postmitotische Zellen hingegen sind stärker von degradativen Prozessen abhängig (Calpain, Proteasomen, Lyse), um sich effektiv von defekten Makromolekülen und Organellen zu befreien, wobei die Aktivierung von Calpain, einer Calcium-abhängigen Protease, am ischämischen Herzen an der Störung der mitochondrialen Funktion beteiligt ist (Trumbeckaite *et al.*, 2003). Lipofuscin, seit mehr als einem Jahrhundert als das Alterspigment bekannt (Porta, 1991), ist ein protein- und cholesterinhaltiges bräunliches Gemisch lipo- und argentophiler Pigmente, das sich alters- und stoffwechselabhängig in Epithelzellen und Zellen mesenchymaler Herkunft anreichert. Die „Mitochondrial-Lysosomal Axis“ Theorie des Alterns nimmt an, dass oxidativ geschädigtes Material (mitochondrial und nichtmitochondrial) weniger abbaubar ist und somit als Lipofuscin in Lysosomen akkumuliert (Sohal *et al.*, 1989; Brunk *et al.*, 1992; Terman *et al.*, 1998).

(2) Das Konzept der *Bildung von Advanced Glycation End Products (AGE)* als Alterungsmechanismus zeigt möglicherweise partielle Überschneidungen zur „Mitochondrial-Lysosomal Axis“ Theorie. AGEs sind durch nichtenzymatische Glykierung und Oxidation modifizierte Proteine und Peptide. Sie bilden sich aus Aminogruppen von Proteinen oder Lipiden, welche reduzierenden Zuckern ausgesetzt werden. AGEs sind eine stark heterogene Gruppe von Molekülen, die oft mehrfache Querverbindungen eingehen können (Brownlee, 1995). Erhöhte Glucosekonzentration und mitochondrial gebildete Radikale wirken zusammen und können so zur Maillard-Reaktion (nichtenzymatische Bräunung) führen (Nishikawa *et al.*, 2000; Giardino *et al.*, 1996). AGEs verursachen durch verschiedene Mechanismen pathologische Organveränderungen. So induzieren extrazelluläre AGEs eine Signaltransduktion für eine veränderte Genexpression, indem sie als Ligand an unterschiedliche Membranrezeptoren binden (RAGES = Rezeptor für AGEs) (Yan *et al.*, 1997). Sie binden lösliche Cytochemokine und ändern dadurch die Aktivität dieser Mediatoren. Intrazellulär gebildete AGEs modifizieren den Abbau von Makromolekülen (Brownlee, 1995; Brownlee, 2000; Pushkarsky *et al.*, 1997) und akkumulieren möglicherweise mit Lipofuscin in den Lysosomen (s.o.). Die Bildung von AGEs kann durch mitochondriale SOD oder mitochondriales *Uncoupling* (siehe 1.3.2) verhindert werden.

(3) Die mitochondriale Radikalproduktion und die damit verbundene oxidative Schädigung der mitochondrialen DNA können zur *Bildung einer disproportionalen Atmungskette* führen, die eine weitere Erhöhung der Radikalbildung auslöst. Der dadurch entstehende Circulus Vitiosus mündet in einen altersassoziierten apoptotischen Zellverlust. Diese Hypothese be-

rücksichtigt neueste Erkenntnisse zur zentralen Rolle mitochondrialer apoptogener Signale während des mitochondrialen Alterns postmitotischer Zellen. Ein kritischer Schritt in der Apoptose ist die starke mitochondriale Radikalbildung, welche teilweise durch Überexpression der MnSOD teilweise unterdrückt werden kann (Wong *et al.*, 1989). Durch die räumliche Nähe der mitochondrialen DNA zur Atmungskette als einem Ort der Radikalproduktion (Abbildung 1-2) und der vermutlich schlechten Reparaturkapazität der Mitochondrien, erscheint die mitochondriale DNA als mögliches Ziel radikalinduzierter Schäden. Aufgrund der hohen Dichte codierender Sequenzen der mitochondrialen DNA, ist zu erwarten, dass radikalinduzierte Schäden zu einer gestörten Neusynthese der mitochondrial codierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe führen (Beckman *et al.*, 1998; Shigenaga *et al.*, 1994; Linnane *et al.*, 1989; Ozawa, 1997). Die Störung betrifft Komplexe mit einem hohen Anteil mitochondrial codierter Proteinuntereinheiten mehr, als solche, die nur kerncodierte Untereinheiten enthalten (Abbildung 1-2). Dies führt zu einer disproportionalen Atmungskette, in der aufgrund von Stauungen im Fluss der Elektronen eine erhöhte Radikalbildung auftritt (Papa *et al.*, 1997). Die Theorie dieses mitochondrialen Circulus Vitiosus birgt jedoch zwei grundlegende Probleme. Zum Ersten verschwinden Zellen, die von diesem Zyklus beeinflusst werden, aus den Organen. Dies erschwert eine Beschreibung, da nur ein geringer Teil (Zellen, die gerade im Stadium der Apoptose sind) detektiert werden können. Zum Zweiten besitzen Mitochondrien mehrere Genome, was in einem Problem des Grenzwertes resultiert: Wie viele mitochondriale Genome müssen geschädigt sein, bis ein Effekt im Phänotyp dieser Mitochondrien eintritt? Wie viele Mitochondrien innerhalb einer Zelle müssen sich in ihrem Phänotyp verändern, bis Apoptose induziert wird? Eine erhebliche Unterstützung für dieses Konzept leitet sich jedoch aus der Analyse erblicher oder erworbener Mitochondriopathien ab. Mutationen oder Deletionen der mitochondrialen DNA in befruchteten Eizellen führen zu einem „Mosaik“ betroffener Zellen in verschiedenen Organen der betroffenen Patienten. Während des Heranwachsens sind diese Patienten oft frei von Symptomen, im frühen Erwachsenenalter leiden sie jedoch unter degenerativen Veränderungen ähnlich dem frühzeitigen Altern von ZNS, Muskulatur, Herz und/oder anderen Organen (Wallace, 1992).

(4) Die „*Reductive Hotspot*“ Hypothese des Alterns besagt, dass die durch oxidative Schädigungen in einer postmitotischen Zelle auftretenden Mutationen und/oder Deletionen der mitochondrialen DNA im weiteren Verlauf der replikativen Zyklen der Mitochondrien klonal expandieren. Das kann unter Umständen zu Mitochondrien führen, die frei von Wildtyp-DNA sind. Unterstützt wird diese Selektion immer dann, wenn die deletierte mitochondriale DNA einen Überlebensvorteil für das betroffene Mitochondrium aufweist (z.B. keine oder wenig

aerobe Atmung und daher verminderte oder unterdrückte Superoxidanionenbildung, die jedoch auch zu einem Defizit in der ATP-Produktion führt) (de Grey, 1997; de Grey, 2000). Solche Zellen ohne mitochondriale Atmung sind auf ihre Plasmamembran-Redoxsysteme angewiesen (Morre *et al.*, 2001; Chueh *et al.*, 2002). Diese können zytosolisches  $\text{NADH}+\text{H}^+$  durch den Transfer der entstehenden Elektronen zu extrazellulärem Sauerstoff oxidieren, wobei nicht nur Wasser, sondern manchmal auch extrazelluläre Superoxidanionen entstehen. Diese bzw. von ihnen abgeleitete andere ROS können zur oxidativen Modifikation von extrazellulärem Material (z.B. LDL) führen. Oxidativ modifiziertes LDL wiederum kann von benachbarten Zellen aufgenommen werden und dort eine weitere Erhöhung der ROS-Bildung induzieren, wodurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus entsteht. Somit führt die klonale Verteilung der mtDNA-Schäden zu Zellen mit einem Mangel an aerober ATP-Bildung und weiterhin verursachen entstehende Superoxidanionen oxidative Schäden in benachbarten Zellen ohne große mtDNA-Schäden (de Grey, 1997; de Grey, 2000).

### 1.3.2 Intramitochondriale antioxidative Schutzmechanismen

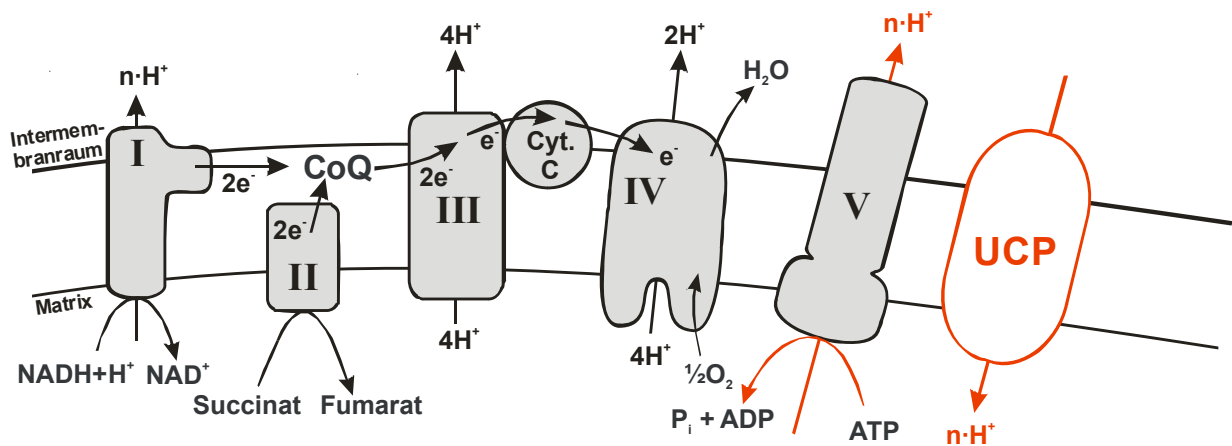
Die oben beschriebenen Prozesse machen effektive und wirkungsvolle intramitochondriale antioxidative Verteidigungsmechanismen notwendig, die auf unterschiedlichen Stufen wirken.

In der ersten Stufe wandelt die mitochondriale Superoxiddismutase (SOD) Superoxidanionen in weniger gefährliches und diffusionsfähiges  $\text{H}_2\text{O}_2$  um und ist damit einer der wesentlichen Bestandteile dieser Mechanismen. Eine transgene Inaktivierung dieses mitochondrialen Enzyms (welches kerncodiert ist und in das Mitochondrium importiert werden muss) führt zu einer frühen postnatalen Letalität mit Defekten im Herzen, Gehirn und anderen Organen (Melov *et al.*, 1999). Jedoch ist diese starke experimentelle Beeinflussung der mitochondrialen Schutzmechanismen nicht dem moderaten oxidativen Stress in Herz und Gehirn während des normalen Alterns äquivalent.

Ein zweiter Schutzmechanismus ist die Senkung des Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) an der inneren Mitochondrienmembran durch mildes *Uncoupling* (Entkoppeln der Atmungskette siehe Abbildung 1-3) (Ricquier *et al.*, 2000). Die kälteinduzierte Thermogenese in braunem Fettgewebe durch mitochondriale UCP (Nicholls *et al.*, 1984) ist schon länger bekannt, wurde aber durch Entdeckung neuer UCP (Fleury *et al.*, 1997) wieder aufgegriffen.

Physiologisches Entkoppeln generiert in braunem Fettgewebe Wärme und wird durch UCP-1 vermittelt. Außerhalb des braunen Fettgewebes werden noch UCP-1 und UCP-2, -3 und -4 exprimiert. Der mit dem *Uncoupling* verbundene Sauerstoff- und ATP-Verbrauch führt zu

einer verminderten Bildung von ROS. Eine Überexpression von UCP führt zu mageren Mäusen mit Fresssucht und erhöhtem  $O_2$ -Verbrauch, deren Mitochondrien ein stark erhöhtes *Uncoupling* zeigen (Clapham *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001). Eine Zerstörung von UCP-2 oder -3 bedingt eine erhöhte mitochondriale Radikalproduktion (Erlanson-Albertsson, 2003; Rousset *et al.*, 2004).



**Abbildung 1-3: Mitochondriales *Uncoupling* durch UCP:** Durch Depolarisierung der inneren Mitochondrienmembran werden unter ATP-Verbrauch Protonen in die Matrix zurückgepumpt.

Durch mildes *Uncoupling* wird die dritte Stufe der mitochondrialen antioxidativen Schutzmechanismen angestoßen, die eine reversible *permeability transition* durch die Öffnung von Megaporen (mitochondrial membrane permeabilization – MMP) beinhaltet. Verantwortlich hierfür sind Proteine der äußeren Mitochondrienmembran (z.B. VDAC – voltage dependent anion channel) und der inneren Mitochondrienmembran. (z.B. ANT – Adenin-Nucleotid-Translokator), die durch proapoptotische Mitglieder der BCL-2-Proteinfamilie (Bax, Bak, Bid, Bim, Bad) aktiviert werden. Es kommt dadurch zu einer weiteren Absenkung von  $\Delta\Psi$  (Kroemer *et al.*, 2000).

Im weiteren Verlauf entsteht daraus in Stufe 4 eine irreversible *permeability transition*, die eine Freisetzung apoptotischer Signale (Cyt c, AIF) verursacht. Zusätzlich kommt es zu einer osmotischen Matrixschwellung aufgrund der Porenbildung durch ANT in der inneren Mitochondrienmembran, die zu einem Aufreißen und somit zur Zerstörung des Mitochondriums führen kann (Desagher *et al.*, 2000). Perimitochondrial aktivierte Caspasen eliminieren die geschädigten Mitochondrien durch Mitoptose, wogegen eine Proliferation überlebender Mitochondrien eintritt (Bernardi *et al.*, 1994; Pastorino *et al.*, 1994; Halestrap *et al.*, 1998).



Die fünfte Stufe stellt sich in der generalisierten *permeability transition* vieler Mitochondrien dar, in deren Folge die aktivierten Caspasen zur apoptotischen Eliminierung der Zelle führen (Kroemer *et al.*, 2000).

### 1.3.3 Prävention des (mitochondrialen) Alterns?

Nicht primär eine Verlängerung des Lebens, sondern vor allem das gesunde Älterwerden und damit eine Steigerung der Lebensqualität sind das Anliegen einer Prävention des Alterns. Zur Frage, ob körperliche Aktivität bzw. Sport „unnötige Erkrankungen“ oder vorzeitige Erkrankungen verhindern oder verzögern kann, liegen gerade im Bereich der koronaren Herzkrankheit bzw. der Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine Vielzahl epidemiologischer Studien vor (Sesso *et al.*, 2000; Drygas *et al.*, 2000; Blair *et al.*, 1993; Paffenbarger *et al.*, 1994).

Durch gesundheitsorientierten Sport kann eine Prävention des Alterns erreicht werden. Konkrete Empfehlung der American Heart Association (AHA 1996) und des American College of Sports Medicine (ACSM 2000) fordern, dass regelmäßig, möglichst täglich, eine moderate körperliche Aktivität von mindestens 30 Minuten Dauer, insbesondere mit Ausdauercharakter und mittlerer Intensität absolviert werden sollte. Explizit werden vor allem die klassischen Ausdauersportarten wie Joggen, Walking, Radfahren, Skilanglauf oder Schwimmen empfohlen, möglichst in Kombination mit einem aktiven Freizeitverhalten mit regelmäßigen Spaziergängen, häufigen Fußwegen, sowie Haus- und Gartenarbeit.

Die einzige experimentelle Manipulation, die eine beständige Erniedrigung der Alterungsrate in allen Spezies gezeigt hat, ist die der Langzeit *Caloric Restriction* (Sohal *et al.*, 1996; Weindruch *et al.*, 1997). Eine einjährige kalorische Restriktion von 40 % der Standarddiät bei jungen adulten Ratten erniedrigte die Rate der Radikalproduktion durch Komplex I in kardialen Mitochondrien *in vitro* sowie den Grad der oxidativen Schäden der mitochondrialen DNA, ohne das Ausmaß derartiger Schäden auf die nukleäre DNA zu beeinflussen (Gredilla *et al.*, 2001).

Weiterhin konnte eine Verringerung von Anzeichen oxidativer Schädigungen in mitochondrialen Proteinen gezeigt werden (Pamplona *et al.*, 2002). Ähnliche Daten wurden an Stellen von Sarkopenie des Skelettmuskels gefunden (Drew *et al.*, 2003; Aspnes *et al.*, 1997), wobei der Effekt auf die Mitochondrien zwischen unterschiedlichen Muskeltypen differierte.

Während diese Daten deutlich zeigen, dass das mitochondriale Altern wesentlich verzögert werden kann, ist bislang noch kein möglicher Mechanismus bekannt, der diese Verzögerung erklären würde. Spekulationen über Änderungen der DNA-Reparaturkapazität, Stresshormone

oder die Expression von *stress resistance*-Genen (Drew *et al.*, 2003) deuten auf einen nukleären Mechanismus hin, der durch kalorische Restriktion beeinflusst wird.

## 1.4 Auswirkungen des Alterns auf das Herz

Mit zunehmendem Alter bildet sich das Herzmuskelgewebe schrittweise um. So findet sich zum Beispiel im Herzmuskel alternder Menschen vermehrt Bindegewebe. Diese Veränderungen stellen mögliche Ursachen für altersbedingte Krankheiten dar. Bei älteren Menschen besteht in der Regel eine schlechtere Fähigkeit des Herzmuskels zur Kontraktion, was zu einer Einschränkung des Herzschlagvolumens führt. Kann durch mangelnde Kraft des Herzens pro Herzschlag nicht mehr so viel Blut ausgeworfen werden, müssen körperliche Belastungen über eine Steigerung der Pulsfrequenz aufgefangen werden. Dabei steigt der Sauerstoffverbrauch des Herzens deutlich gegenüber dem jüngerer Menschen an.

Eine mögliche Folge davon sind Kardiomyopathien, d.h. Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer Funktionsstörung einhergehen. Die bei weitem häufigste Form der Kardiomyopathie ist die dilatative Form (DCM); hämodynamisch handelt es sich um einen überwiegend systolischen Pumpfehler. Bei einem Großteil dürfte sie Folge einer entzündlichen viralen oder sekundären immunmedierten Pathogenese sein. Von den spezifischen DCM sind außerdem die ischämische, die hypertensive und die toxische Kardiomyopathie von Bedeutung (Fölsch *et al.*, 2000). Weiterhin kann eine gestörte Erregungsleitung zu Herzrhythmusstörungen führen. Unter den organischen Ursachen sind ischämische, degenerative und postinflammatorische Ursachen am häufigsten zu nennen. Schon ab dem 30. Lebensjahr beginnen sich auch die Wände der Blutgefäße zu verändern. Im höheren Alter tritt vermehrt Arteriosklerose auf. Verengungen und Verhärtungen der Blutgefäße führen zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit des Kreislaufes an Belastungen. Sind auch die Herzkranzgefäße von arteriosklerotischen Plaques betroffen, kann dies zur Ausprägung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) führen, die wiederum in einen Myokardinfarkt münden kann (Fölsch *et al.*, 2000).

Histomorphologische Befunde zeigen eine Reduktion der Myozyten des linken Ventrikels im Alter, wobei dies bei Männern stärker als bei Frauen beobachtet wird. Das ist jedoch kein Ergebnis des primären Alterns, sondern vielmehr eine Folge vorangegangener Erkrankungen (Myokarditis, Mikroinfarkte). Untersuchungen der Zellkerne zeigen Anzeichen von Apoptose und Nekrose. Als Konsequenz kommt es für die verbleibenden Myozyten bei gleich bleibender Herzgeometrie zu einer Überlast. Eine Veränderung des Phänotyps zeigt sich dann auf

unterschiedlichen Ebenen. So kommt es zu einer Hypertrophie der Myozyten, zur Einlagerung von Bindegeweben, der Verbindung (*Coupling*) einzelner Myozyten, einer gestörten Erregungsleitung und zu Veränderungen von Rezeptoren und damit der Signaltransduktion.

Die kritische Abnahme der Blutausswurfleistung des Herzens mit einer Gefährdung der Organdurchblutung und drohendem Kreislaufversagen wird als Herzinsuffizienz bezeichnet. Eine solche Herzinsuffizienz ist häufig Folge verschiedener Herzerkrankungen und betrifft vor allem die ältere Bevölkerung. In bis zu 70 % der Fälle ist sie durch eine Pumpschwäche des Myokards aufgrund einer koronaren Herzkrankheit bedingt. Richtungsweisende Symptome sind eine Abnahme der körperlichen Belastbarkeit, Luftnot und Unterschenkelödeme. Die Herzinsuffizienz ist als ein Sammelbegriff aufzufassen und darf nicht unabhängig von der zugrunde liegenden Herzerkrankung gesehen werden. Die Funktionsstörung kann sowohl durch eine primäre Herzmuskelschwäche als auch durch krankhafte Veränderungen anderer Herzabschnitte, z.B. der Herzklappen oder des Herzbeutels hervorgerufen werden. Der manifesten Herzinsuffizienz mit klinischen Symptomen geht zumeist eine frühe kardiale Funktionsstörung, eine so genannte ventrikuläre Dysfunktion voraus. In diesem frühen Stadium ist bereits echokardiographisch ein erhöhter Füllungsdruck in der linken Herzkammer nachweisbar. Zur Charakterisierung der Herzinsuffizienz werden verschiedene Termini verwendet. In Bezug auf den zeitlichen Ablauf unterscheidet man eine meist schnell verlaufende akute Herzinsuffizienz, z. B. bei einem akuten Myokardinfarkt, und eine chronische Herzinsuffizienz. Je nachdem ob die linke oder rechte Herzkammer maßgebend am Pumpversagen beteiligt ist, wird eine Linksherzinsuffizienz von einer Rechtsherzinsuffizienz unterschieden. Die klinischen Symptome sind hier zum Teil sehr unterschiedlich. Ist die Pumpfunktion beider Herzkammern eingeschränkt, spricht man von einer globalen Herzinsuffizienz.

Die Veränderungen, die in insuffizienten Geweben auftreten, gleichen denen in Geweben alter Patienten (Lakatta *et al.*, 2000; Lakatta, 2002). Durch die funktionellen Ähnlichkeiten der experimentellen Herzinsuffizienz zum Altersmyokard in Tiermodellen stellt die Herzinsuffizienz mit ihren Symptomen ein geeignetes Modell für die vorzeitige Alterung des Herzens dar. Gewebe insuffizienter Patienten sind für Forschungszwecke leichter erhältlich, als Gewebe alter Menschen. Humanes Altersmyokard ist in der Regel nicht verfügbar. Aus diesem Grund eignen sich die Proben insuffizienten Myokards sehr gut, um altersabhängige Veränderungen an humanen Proben zu untersuchen.

Ein durch Apoptose verursachter Myozytenverlust wurde bei einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet. Das Absterben von Kardiomyozyten durch Apoptose ist damit ein prominentes pathologisches Merkmal der chronisch ischämischen Herzinsuffizienz und

des Myokardinfarkts und wird mit Erkrankungen wie der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie, bei der kardiale Arrhythmien im Vordergrund stehen, in Zusammenhang gebracht. Die Apoptose von Kardiomyozyten kann durch Hypoxie, eine wichtige Komponente der Ischämie und der durch sie ausgelösten elektrischen Störungen, experimentell ausgelöst werden. So konnte beim Menschen im Myokard terminal insuffizienter Herzen vermehrt Apoptose von Kardiomyozyten gefunden werden (Narula *et al.*, 1996; Olivetti *et al.*, 1997; Saraste *et al.*, 1999). Allerdings variieren die Angaben über das Ausmaß an betroffenen Kardiomyozyten zum Teil beträchtlich. Verschiedene Tiermodelle, wie zum Beispiel Tachystimulation (supranormale Herzfrequenz durch elektrische Schrittmacher) oder intrakoronare Embolie in Hunden, spontan hypertensive Ratten oder Aortenstenose in Ratten, zeigten eine deutliche Korrelation zwischen dem Auftreten von Apoptose und der Entstehung einer Herzinsuffizienz (Li *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1995; Sharov *et al.*, 1996; Teiger *et al.*, 1996).

## 1.5 Aufgabenstellung

Prozesse der Alterung sind mit mitochondrialen Veränderungen verbunden. Im Altersmyokard wurden akkumulierende Schäden der mitochondrialen DNA gezeigt, die möglicherweise Ursache mitochondrialer Funktionsstörungen sind. Bisher sind jedoch noch nicht alle dafür verantwortlichen Mechanismen untersucht. Die Aufgabe der vorliegenden Dissertation zur Klärung von Zusammenhängen zwischen ausgewählten funktionellen Parametern der Mitochondrien und der mitochondrialen Transkription bestand in folgender Vorgehensweise:

*In einem ersten Teilansatz* sollte mittels respirometrischer Messungen durch eine geeignete Kombination verschiedener Substrate und Hemmstoffe die Funktion der Mitochondrien in einer permeabilisierten Muskelfaser untersucht werden, um damit mögliche Störungen im Energiestoffwechsel aufzuklären.

*In einem zweiten Ansatz* sollten funktionelle Parameter der mitochondrialen Atmungskette durch Bestimmung der Enzymaktivitäten erfasst werden. Hier sollten durch Messungen an mehreren unterschiedlichen Komplexen der Atmungskette mögliche Imbalancen aufgezeigt werden (vgl. 1.3.1).

*In einem dritten Schritt* sollte die Quantifizierung von drei mitochondrialen Transkripten erfolgen, die über eine gemeinsame Promotorstruktur gesteuert werden. Dabei sollte von jedem Primärtranskript des mitochondrialen Genoms exemplarisch ein Gen ausgewählt werden. Um einen Vergleich zu nukleär codierten Genen zu erhalten, sollte zusätzlich ein kern-codiertes Gen für ein mitochondriales Protein untersucht werden. Weiterhin sollte die Expression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors mtTFA als mögliche regulatorische Komponente im Alter bestimmt werden.

Abschließend sollte *in einem 4. Ansatz* die mitochondriale DNA mittels Southern Blot untersucht werden, um sowohl Aussagen über die Quantität der mitochondrialen DNA als auch über mögliche Schädigungen (Deletionen) treffen zu können.

Für die geplanten Experimente sollten dabei im Tiermodell alte und junge Ratten verschiedener Stämme eingesetzt werden. Für die Untersuchungen an humanen Proben war der Einsatz von insuffizientem Myokard und Spendermyokard vorgesehen. Diese Gewebe sind zum einen leichter erhältlich, als Gewebe alter Menschen und zum anderen stellt die Herzinsuffizienz mit ihren Symptomen ein Modell für die vorzeitige Alterung des Herzens dar (vgl. 1.4).

## 2 MATERIAL

### 2.1 Tierische Gewebe

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Organe bzw. Organteile ausschließlich von männlichen Ratten verwendet. Die Haltung und Präparation der Tiere erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. H. Foth.

Für die Experimente wurden Sprague-Dawley-Ratten (Hsd: Sprague-Dawley – Auszucht-Ratten<sup>1</sup>) und Fisher-Ratten (F344/NHsd – Inzucht-Ratten<sup>2</sup>) eingesetzt, um mögliche Unterschiede zwischen diesen Stämmen darstellen zu können. Die Tiere wurden von Harlan Winkelmann (Harlan Winkelmann GmbH, Borchten) bezogen.

Es handelte sich um gesunde Tiere, deren Organe unterschiedlichen Experimenten dienten. In der Regel wurden den Tieren nach Betäubung mit Pentobarbital (Sigma Aldrich, Deisendorf) die Organe entnommen. Herz- und Skelettmuskeln wurden entsprechend der jeweiligen Aufgabenstellung präpariert. Gewebe für die Untersuchung der Genexpression und Enzymaktivität wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren, Gewebe für die Mikrorespirometrie in 4 °C kalten Storagepuffer überführt. Diese Materialien wurden in Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg verwendet.

Die für die Versuche notwendigen genehmigten Tierschutzanträge lagen vor.

---

<sup>1</sup> Inzucht: Verpaarung verwandter Tiere. Eine Tierpopulation ist dann ein Inzuchtstamm, wenn mindestens 20 Generationen fortlaufend eine Bruder-Schwester- bzw. Eltern-Nachkommen-Paarung durchgeführt wurde. Durch die Zunahme der Homozygotie sinkt die genetische Varianz. Die Tiere sind krankheitsanfälliger, reagieren stärker auf Stressoren und sind weniger anpassungsfähig. Demgegenüber zeigen sie stammesspezifisch in hohem Maße gleiche Reaktionen. (Inzuchttiere sind eineiigen Zwillingen gleichzusetzen). Viele polyfaktoriell bedingte Merkmale werden dadurch gefestigt und relativ konstant weitergegeben: Tumorraten, LD50, ED50 (Ansprechen auf Pharmaka, Strahlung, etc.) u.a.

<sup>2</sup> Auszucht: Kreuzen zweier Tiere, die nachweislich über mindestens sechs Generationen keine gemeinsamen Vorfahren besitzen. Eine Auszuchtpopulation ist gekennzeichnet durch eine konstante Heterozygotie. Auszucht-tiere sind vitaler, fruchtbarer und anpassungsfähiger. Damit erreicht man eine neue Population mit breitem Reaktionsspektrum (biologisch divergent). (nach: Heinecke H. Angewandte Versuchstierkunde. Urban & Fischer Verlag. 1989; Jena)

## 2.2 Humane Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde humanes Probenmaterial verwendet. Es handelte sich dabei um Myokardgewebe aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. R.-E. Silber. Weiterhin stand eine Skelettmuskelbiopsie aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. S. Zierz zur Verfügung.

Von den explantierten Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz wurde bei der Transplantation linksventrikuläres Myokard (LV) entnommen. Bei der Gewebeentnahme wurde darauf geachtet, die Proben aus nicht sichtbar infarzierten Bereichen des Herzens zu erfassen. Für die Kontrollen stand Gewebe des linken Ventrikels von Spenderherzen zur Verfügung, die aus verschiedenen klinischen Gründen nicht transplantiert werden konnten. Die Myokardproben wurden unverzüglich nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert. Von den 43 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz waren 20 an einer ICM<sup>3</sup> erkrankt ( $55,7 \pm 1,3$  Jahre) und 23 an einer DCM<sup>4</sup> ( $49,0 \pm 1,9$  Jahre,  $p < 0,01$ ). Die Patienten mit DCM hatten eine schlechtere Herzfunktion (EF<sup>5</sup>:  $21,8 \pm 1,6$  % DCM vs.  $27,5 \pm 2,0$  % ICM,  $p < 0,05$ ; PCW<sup>6</sup>;  $23 \pm 2$  mm Hg DCM vs.  $17 \pm 2$  mm Hg ICM,

---

<sup>3</sup> Die ischämische Kardiomyopathie (ICM) zeichnet sich dadurch aus, dass dem myokardialen Sauerstoffbedarf ein nur unzureichendes Sauerstoffangebot gegenübersteht und dadurch eine akute oder chronische myokardiale Dysfunktion die Folge ist. In der ganz überwiegenden Mehrzahl der Fälle ist dies auf eine unzureichende Perfusion bei koronarer Herzkrankheit (KHK) zurückzuführen. Sie stellt somit das Endstadium der koronaren Herzerkrankung dar. Eine systemische Hypotonie, z.B. beim Kreislaufchock kann jedoch dieselbe Wirkung haben. Eine Ischämie der Herzmuskulatur kann auch durch verminderte Sauerstofftransport- oder bindungskapazität des Bluts oder durch einen erhöhten Sauerstoffbedarf des Myokards bedingt sein.

<sup>4</sup> Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Dilatation des linken und/oder rechten Ventrikels mit begleitender schwerer Einschränkung der Pumpfunktion gekennzeichnet (überwiegend systolische Kontraktionsstörung). Nach einer Erkrankung des Herzmuskels, die eine Schädigung hinterlassen hat, kann eine eingeschränkte Pumpfunktion mit einer Vergrößerung beider Herzkammern als Folgekrankheit auftreten. In jedem Stadium der Erkrankung kann es zu Herzrhythmusstörungen sowie einem plötzlichen Herztod kommen.

<sup>5</sup> ejection fraction: Die Auswurffraktion wird echokardiographisch gemessen und beschreibt die Pumpleistung des Herzens.

<sup>6</sup> pulmonary capillary wedge: Der PCW wird über einen Einschwemmkatheter gemessen und ist ein Maß für den Füllungsdruck des linken Ventrikels.

$p = 0,07$ ). Der CI<sup>7</sup> und das Geschlechtsverhältnis (21 ♂/2 ♀ bei DCM und 18 ♂/2 ♀) waren in beiden Gruppen ähnlich. Die Patienten mit DCM hatten in allen Fällen angiographisch normale Koronararterien. Von den Spenderherzen ( $n = 10$ ), die nicht zur Transplantation verwendet wurden, wurden keine hämodynamischen Daten ermittelt. Die Patienten wurden vor dem Eingriff über die Verwendung des anfallenden Materials informiert und gaben ihre Einwilligung zu wissenschaftlichen Untersuchungen. Die Verwendung des humanen Materials wurde von der Ethikkommission der Universität genehmigt.

### 2.3 Bakterienstämme und Vektoren

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10F'	F' [ <i>lacI<sup>q</sup></i> Tn10 (Tet <sup>R</sup> )] <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen (Groningen, NL)
Plasmid	Merkmale	Referenz
pCR <sup>®</sup> II-TOPO	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , MCS im <i>lacZ</i> -Gen M13 und T7 Primerbindungsstellen	Invitrogen (Groningen, NL)

### 2.4 Geräte und Chemikalien

Bakterienschüttler Certomat U/H	Braun, Melsungen
Brutschrank	Memmert GmbH + CoKG, Schwabach
Eppendorf Tisch- und Tischkühlzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Mini, Midi und Maxi Gel-System	MWG Biotech AG, Ebersberg
Power Supply PS 250 und PPS 200-10	MWG Biotech AG, Ebersberg
PowerPac 3000 Supply und 200/2.0	BioRad, München
Refrigerated Superspeed Zentrifuge RC-5B	Sorvall, Newtown USA
Spektralphotometer Biochrom 4060	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
UV-Transilluminator	Schütt, Göttingen

<sup>7</sup> cardiac index [l/min/m<sup>2</sup>A<sub>0</sub>]: Der cardiac index ist definiert als das durchschnittliche Herz-Zeit-Volumen, dividiert durch die Körperoberfläche.



---

Photometer Beckmann DU 600	Beckman Coulter, Unterschleißheim
Präzisionswaage KERN 770/GS/GJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Oxygraph Oroboros®	Anton Paar, Graz, Österreich
Ultra-Turrax	IKA-Werke, Staufen

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg) synthetisiert. Die Reaktionen erfolgten idR. in 500 µl Tubes (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen).

Chemikalien, Enzyme, Feinchemikalien und Kits wurden in analysenreiner Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe	Invitrogen, Karlsruhe
InViTek GmbH, Berlin	Merck, Darmstadt
Peqlab, Erlangen	Promega GmbH, Mannheim
Qiagen, Hilden	Roche Diagnostics, Mannheim
Serva, Heidelberg	Sigma Aldrich, Deisendorf

### 3 METHODEN

#### 3.1 Mikrorespirometrische Messungen

##### 3.1.1 *skinned fiber*-Technik zur Permeabilisierung der Muskelfasern

Bei der *skinned fiber*-Technik (Veksler *et al.*, 1987) werden Muskelfasern zuerst mechanisch mit Hilfe von Nadeln und anschließend chemisch mit dem milden Detergenz Saponin permeabilisiert. Die Zellmembranen der Muskelfasern konnten mit Saponin optimal permeabilisiert werden, da es eine hohe Affinität zum Cholesterol der Zellmembran aufweist (Saks *et al.*, 1998). Dagegen bleiben die Mitochondrien und andere Zellorganellen aufgrund ihres sehr geringen Cholesterolgehaltes funktionell intakt (Kunz *et al.*, 1993). Die Methodik erlaubt somit eine Detektion akuter mitochondrialer Defekte im humanen Herz- und Skelettmuskel (Letellier *et al.*, 1992). Der Vorteil dieser Technik gegenüber der Verwendung isolierter Mitochondrien besteht insbesondere darin, dass über 90 % der im Muskel vorhandenen Mitochondrien erfasst werden, was bei der Untersuchung heterogener Populationen wichtig ist.

	Isolierte Mitochondrien	Muskelfasern
minimaler Bedarf	ca. 400 mg	ca. 50 mg
Ausbeute	10 – 30 % Ausbeute, partielle Isolationsschädigungen	> 90 % der Mitochondrien werden erfasst
Stabilität	4 – 5 h	bis zu 30 h in Storagepuffer
morphologischer Zustand	geschwollen	nicht geschwollen
Präparation	100 min	35 min
Untersuchungsgut	homogene Suspension	heterogene Faserbündel
Bezugsgröße	Protein, Cyt aa <sub>3</sub>	Feuchtgewicht, Cyt aa <sub>3</sub>

**Tabelle 3-1: Vor- und Nachteile der Verwendung isolierter Mitochondrien gegenüber permeabilisierten Muskelfasern (Gellerich *et al.*, 1995).**

##### 3.1.2 Aufarbeitung der Proben

Im Anschluss an die Präparation der Versuchstiere wurden die entsprechenden Proben bis zur Permeabilisierung in frischem Storagepuffer (4 °C, pH 7,1) aufbewahrt. Die Präparation

(Veksler *et al.*, 1987) wurde im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Etwa 20 mg der Muskelprobe wurde in einer auf Eis stehenden Petrischale mittels kleiner Pinzetten und feiner Kanülen zerkleinert. Die feinen Fasern wurden in 2 ml Storagepuffer und Saponin (50 µg/ml) überführt und 30 min bei 1.000 min<sup>-1</sup> auf einem Minishaker (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) permeabilisiert. Zur Entfernung des Saponins wurde 3x 10 Minuten in 5 ml eiskaltem Inkubationsmedium gewaschen. Die permeabilisierten Muskelfasern wurden auf Filterpapier leicht abgetupft und die Ansätze (s.u.) abgewogen.

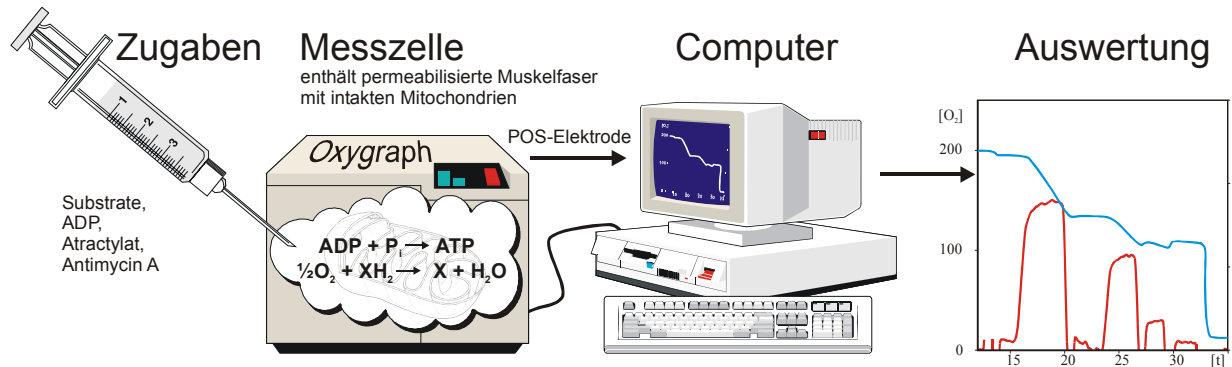
<i>Storagepuffer, pH 7,1</i>		<i>Inkubationsmedium, pH 7,4</i>	
49 mM	K <sup>+</sup> -MES	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
3 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	75 mM	Mannitol
20 mM	Taurin	25 mM	Sucrose
0,5 mM	DTT	100 mM	KCl
29 mM	Imidazol	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
9,5 mM	MgCl <sub>2</sub> x6 H <sub>2</sub> O	0,5 mM	EDTA
5,2 mM	ATP	20 mM	Tris HCl
15 mM	Kreatinphosphat	0,5 mM,	DTT
1,9 mM	Ca-EGTA	1 mg/ml	BSA
8,1 mM	K-EGTA		

Die Puffer wurden aliquotiert und bei -18 °C gelagert. Dem Inkubationsmedium wurden vor seiner Verwendung 1 mg BSA/ml Medium zugesetzt, um endogene Fettsäuren zu maskieren, die eine Entkopplung der Mitochondrien bewirken könnten.

### 3.1.3 Mikrorespirometrie

Die mikrorespirometrischen Messungen wurden im Oxygraphen Oroboros<sup>®</sup> (Haller *et al.*, 1994) (Anton Paar, Graz, Österreich) bei 30 °C im Inkubationsmedium in zwei separaten, temperierbaren Messzellen bei 350 min<sup>-1</sup> mindestens als Zweifachbestimmung durchgeführt. Pro Messung wurden ca. 3 mg ww Herzmuskelfasern bzw. 10 mg ww Skelettmuskelfaser in einem Gesamtvolumen von 1,42 ml eingesetzt. Zwei polarographische Sauerstoffsensoren (Platin-Kathode und Silber-Anode) erfassen die Sauerstoffkonzentration in den beiden Messkammern. Beide Elektroden sind von einer gesättigten Kaliumchloridlösung umgeben. Der gesamte Sensoraufbau ist mit einer dünnen, sauerstoffdurchlässigen Teflonmembran ummantelt, damit der in der Probe enthaltene Sauerstoff durch die Membran diffundieren und an der

Kathode reduziert werden kann. Der gemessene Stromfluss ist der Sauerstoffkonzentration in der Messprobe direkt proportional. Die Erfassung der Sauerstoffkonzentration und deren erste Ableitung als Atmungsgeschwindigkeit erfolgten mit der dazugehörigen Analysesoftware.



**Abbildung 3-1: schematische Darstellung zur Untersuchung der Mitochondrienfunktion im Oxygraphen:** POS-Elektrode: polarographischer Sauerstoffsensoren;  $XH_2$ : Substrat, X: oxidiertes Substrat. In der luftdicht verschlossenen Messzelle befinden sich die permeabilisierten Muskelfasern im auf 30 °C temperierten Inkubationsmedium. Mit einer Kanüle werden die Substrate, ADP sowie Hemmstoffe über eine Kapillare zugegeben. Die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration in der Messzelle erfolgt mittels POS-Elektrode. Die erfassten Daten werden mit einem PC ausgewertet.

Isolierte Mitochondrien oxidieren Substrat und verbrauchen Sauerstoff nur dann, wenn ihnen ADP und anorganisches Phosphat angeboten werden. 1956 wurden von Britton Chance fünf Zustände definiert, bei denen die Atmungsgeschwindigkeit in den Mitochondrien durch jeweils verschiedene Faktoren kontrolliert wird (Löffler *et al.*, 1998) (Tabelle 3-2).

	im Überschuss vorhanden	Begrenzung der Atmungsgeschwindigkeit durch
State 1	$O_2$	ADP und Substrat
State 2	$O_2$ , ADP	Substrat
State 3	$O_2$ , ADP, Substrat	Maximalgeschwindigkeit der Enzyme der Atmungskette
State 4	$O_2$ , Substrat	ADP
State 5	ADP, Substrat	$O_2$

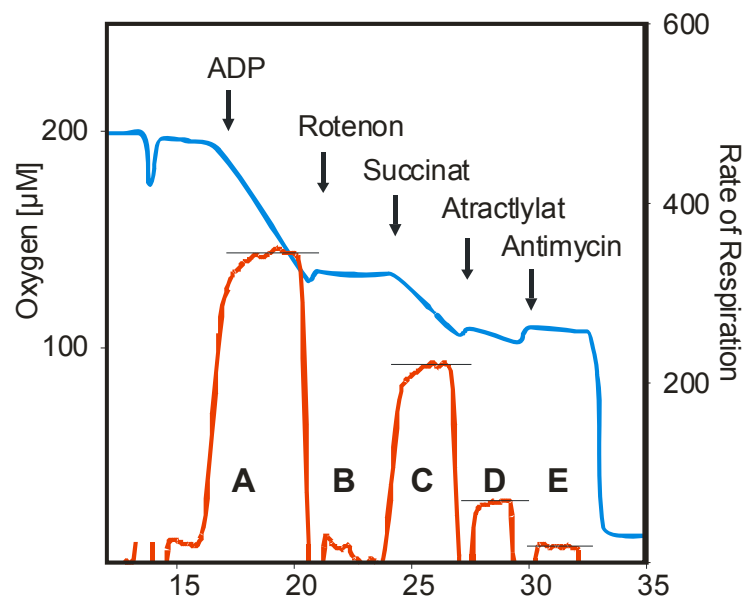
**Tabelle 3-2: Funktionszustände von Mitochondrien nach Britton Chance:** Besondere Bedeutung kommt State 3 und State 4 zu. Während in State 3 der maximal mögliche Elektronentransport stattfindet, ist in State 4 der Sauerstoffverbrauch durch Fehlen von ADP limitiert (kontrollierte Atmung).

### 3.1.3.1 Prinzip der Atmungsmessungen

Mittels respirometrischer Messungen ist es möglich, durch eine geeignete Kombination verschiedener Substrate (u.a. Pyruvat und Succinat) und Hemmstoffe (Tabelle 3-3) die gesamte Funktion der Mitochondrien zu untersuchen und damit mögliche Störungen im Energiestoffwechsel aufzuklären (Sperl *et al.*, 1997).

Enzym	Inhibitor
Komplex I	Rotenon, Barbiturate
Komplex II	Malonat
Komplex III	Antimycin A
Komplex IV	HCN, CO, H <sub>2</sub> S
F <sub>0</sub> /F <sub>1</sub> -ATPase	Oligomycin
Adenin-Nucleotid-Translokator	Atractylat

**Tabelle 3-3: Übersicht über ausgewählte Enzyme der Atmungskette und deren Inhibitoren:** Durch geeignete Auswahl der Hemmstoffe lässt sich die Atmungskette an definierten Stellen unterbrechen und somit vorgeschaltete Prozesse genauer untersuchen.



**Abbildung 3-2: Beispieldiagramm für die mikrorespirometrische Untersuchung von Muskelfasern:** Die blaue Kurve stellt die Sauerstoffkonzentration während der Versuchsreihe dar, die rote Kurve spiegelt die Atmungsrate wieder. Die Pfeile repräsentieren die Zugabe der verwendeten Substrate bzw. Hemmstoffe. A: *State 3*, B: Rotenon-insensitive Atmung, C: Succinatatmung, D: *State 4*, E: Antimycin-resistente Atmung

Nach Zusatz der permeabilisierten Muskelfaser kann die mitochondriale Atmung durch Gabe von ADP und anorganischem Phosphat stimuliert werden (Abbildung 3-2). Die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches ist maximal (*State 3*), da ADP durch den ANT im Verhältnis 1:1 gegen mitochondrial gebildetes ATP in den Matrixraum transportiert wird. Anschließend wird durch die Zugabe von Rotenon Komplex I gehemmt, und die Rotenon-insensitive Atmung ermittelt. Die Aktivität von Komplex II ist nach Gabe von Succinat messbar. Durch Zugabe von Atractylat kann der ANT gehemmt und damit verbunden die Phosphorylierung durch Fehlen von ADP limitiert werden. Die Mitochondrien müssten aufhören zu atmen; jedoch ist an diesem Punkt die Atractylat-insensitive Atmung (*State 4* – enthält Leak, siehe unten) messbar. Die sich einstellende kontrollierte Atmung kann durch weiteren Zusatz von Antimycin A durch die Unterbrechung des Elektronentransportes an Komplex III eingeschränkt werden. Aus dem Unterschied zwischen Antimycin-resistenter Atmung und *State 4*-Atmung ist es möglich, Rückschlüsse über Permeabilitätsänderungen der mitochondrialen Innenmembran zu ziehen, die durch Entkopplung und/oder *permeability transition* hervorgerufen werden können. Da kein ADP zu ATP umgewandelt wird, dürften keine H<sup>+</sup> in die Matrix einströmen, was jedoch trotzdem durch Leaks erfolgt.

### 3.1.3.2 Mitochondriale Atmungsgeschwindigkeit und respiratorischer Kontrollindex

Die Atmungsgeschwindigkeit als erste Ableitung der Sauerstoffkonzentration über die Zeit wurde mit der Software DATAGRAPH Analysis Oroboros<sup>®</sup> (Anton Paar, Graz, Österreich) [nmolO<sub>2</sub>/min/mg ww] ermittelt. Der respiratorische Kontrollquotient (RCI; s.u.) (Svatkova *et al.*, 1996) quantifiziert die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Bildung und erlaubt Aussagen über mögliche Schäden der mitochondrialen Innenmembran, da durch den entstehenden Protonenrückfluss ohne ATP-Synthese eine erhöhte *State 4*-Atmung zu verzeichnen wäre. Je kleiner der Zahlenwert ist, desto stärker ist die Schädigung der Mitochondrien.

$$\text{RCI} = \frac{\text{State 3 - Atmung}}{\text{State 4 - Atmung}}$$

## 3.2 Messungen der Enzymaktivität

### 3.2.1 Herstellung der Gewebehomogenate

Für die enzymatischen Untersuchungen wurden die Gewebeproben nach der Präparation unverzüglich in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Auswiegen der kleinen Muskelproben erfolgte auf einer elektronischen Präzisionswaage KERN 770/GS/GJ, (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern). Die Muskelhomogenate wurden in 2 ml Glas/Glas-Handhomogenisatoren (Kontes Glass Co., NJ, USA) in Chappell-Perry-Medium hergestellt (Trumbeckaite *et al.*, 2001).

*Chappell-Perry-Medium, pH 7,5*

100 mM	KCl	1 mM	EDTA-Na
5 mM	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	Tris-HCl

### 3.2.2 Messung der Enzymaktivitäten

Die Messungen wurden an einem Beckman DU 600 Photometer (Beckman Coulter, Unterschleißheim) spektralphotometrisch nach Warburg (Warburg *et al.*, 1936) durch Doppelbestimmung mit unterschiedlichen Homogenatmengen bei 30 °C durchgeführt. Als Referenz diente jeweils ein vollständig pipettierter Ansatz ohne Homogenat. Die Enzymaktivitäten wurden im linearen Abhängigkeitsbereich von Reaktionsgeschwindigkeit zur Homogenatmenge gemessen und nach folgender Formel bestimmt:

$$U/g_{ww} = \frac{\Delta E/\text{min} \cdot M_v \cdot F}{\varepsilon \cdot P_v}$$

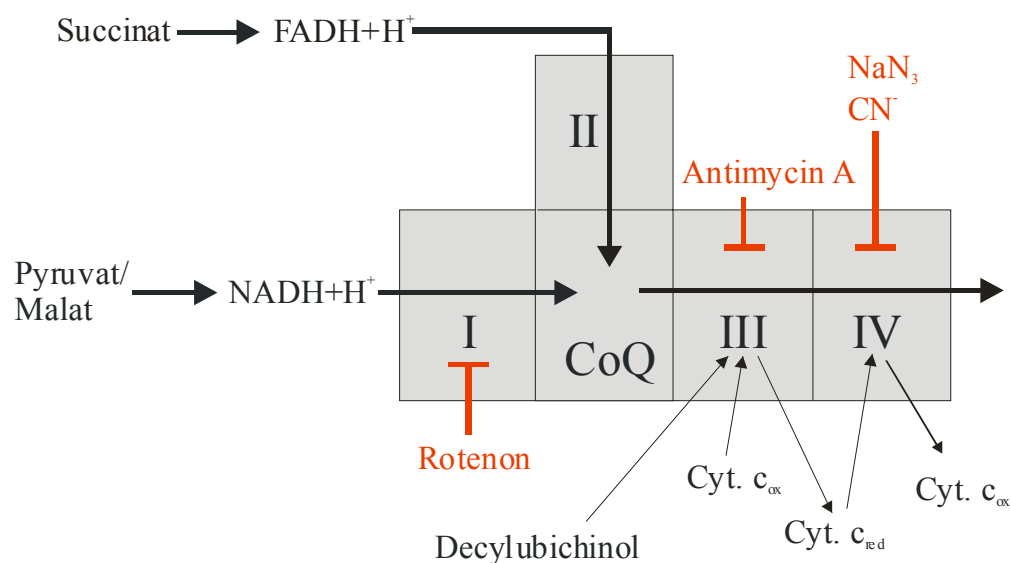
U/g <sub>ww</sub>	Enzymeinheit pro Gramm ww	F	Verdünnungsfaktor des Homogenates
ΔE/min	Extinktionsveränderung pro Minute	ε	molarer Extinktionskoeffizient [mM <sup>-1</sup> /cm]
M <sub>v</sub>	Messvolumen der Küvette [μl]	P <sub>v</sub>	Probenvolumen [μl]

Eine internationale Enzymeinheit (U) entspricht dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute. Als Bezugsgröße für die gewonnenen absoluten Messwerte dienten das Feuchtgewicht der Proben (wet weight – ww), Nichtkollagen-Protein (NCP) und die Citratsynthase. Durch einen Abgleich auf NCP wird der Messwert auf Nichtstruktur-Proteine normalisiert. Ein unter-

schiedlich hoher Gehalt an Kollagen (z.B. Sehnenansatz des Muskels) in den Proben würde bei gleichem Feuchtgewicht zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, da die Strukturproteine an der gemessenen Enzymaktivität keinen Anteil haben.

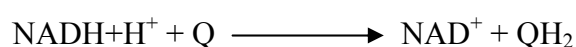
Die Umsatzrate im Citratcyclus ist hinsichtlich des ATP-Bedarfes der Zelle genau einreguliert. Die Synthese von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA ist hier ein wichtiger Kontrollpunkt. Das ATP hemmt als allosterischer Inhibitor die Citratsynthase durch eine Erhöhung des  $K_M$ -Wertes für Acetyl-CoA (Stryer, 1996). Je höher der ATP-Spiegel steigt, um so weniger wird die Citratsynthase mit Acetyl-CoA gesättigt, und um so weniger Citrat entsteht. Die Aktivität der Citratsynthase als ein mitochondriales Leitenzym (Shepherd *et al.*, 1969) kann somit als Marker für den Grundumsatz der Probe herangezogen werden, um die Daten der Enzymaktivitätsmessungen unterschiedlicher Proben zu normalisieren, da ihre Aktivität mit dem Mitochondriengehalt der Probe korreliert (Schwermann *et al.*, 1989).

Abbildung 3-3 zeigt das Messprinzip der Bestimmung der Enzymaktivität.



**Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Messung der Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe:** Durch geeignete Kombination von Substraten und Hemmstoffen konnten die einzelnen Komplexe der Atmungskette spektralphotometrisch untersucht werden.

### 3.2.2.1 Komplex I



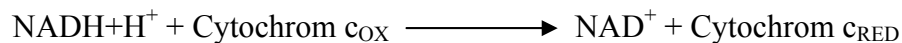
Bei der Bestimmung der Aktivität von Komplex I (Lenaz *et al.*, 1995) wurde die Abnahme von  $NADH+H^+$ , welches als Substrat zugegeben wurde, gemessen. Die Hemmung von Kom-



plex III und somit des weiteren Verlaufs der Atmungskette erfolgte mit Antimycin A. Das später zugesetzte Rotenon hemmte den Komplex I. Da es eine Rotenon-insensitive Atmung des Komplexes I gibt, mussten diese Werte bei der Auswertung abgezogen werden, um ausschließlich den Komplex I zu messen.

Testansatz:	KCl-Tris-EDTA Puffer	pH 7,4	KCN	1 mM
	Antimycin A	1 $\mu$ M	NADH+H <sup>+</sup>	75 $\mu$ M (frisch)
	Coenzym Q1	6 mM	Rotenon	3 $\mu$ M
	- Homogenat (1:30)	20 $\mu$ l; 40 $\mu$ l		
	- Messdauer 3 min; $\lambda$ : 340 nm; $\epsilon$ : 6,22			

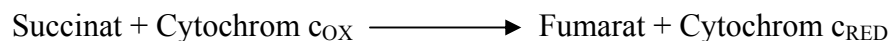
### 3.2.2.2 Komplex I + III



Gemessen wurde die Zunahme von reduziertem Cytochrom c. Als Substrat diente NADH+H<sup>+</sup>. Hierbei war die Aktivität der Cytochrom-c-Reduktase (innere Mitochondrienmembran) selektiv durch Antimycin A hemmbar, so dass die nach Inhibition verbleibende NADH+H<sup>+</sup> oxidierende Aktivität der Cytochrom-b-Reduktase bestimmbar wurde. Dadurch ist der Komplex I der limitierende Faktor dieser Reaktion und kann somit durch Differenzbildung noch genauer bestimmt werden.

Testansatz:	Kalium-Phosphat Puffer	1 M; pH 8,0	EDTA-Na	10 mM; pH 8,0
	NaN <sub>3</sub>	0,1 M	Cytochrom c	1 %
	Antimycin A	1 $\mu$ M	Ethanol	
	NADH+H <sup>+</sup>	10 mM		
	- Homogenat (1:30)	10 $\mu$ l, 20 $\mu$ l		
	- Messdauer: 180 s; $\lambda$ : 550 nm; $\epsilon$ : 21,1			

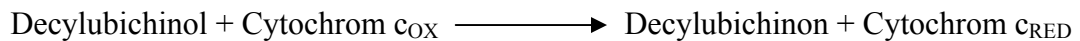
### 3.2.2.3 Komplex II + III



Gemessen wurde die Zunahme von reduziertem Cytochrom c durch Zugabe von Succinat als Substrat.

Testansatz:	Kalium-Phosphat-Puffer	1 M; pH 7,4	EDTA-Na	10 mM; pH 7,4
	BSA	1 %	NaN <sub>3</sub>	0,1 M
	Succinat	0,5 M	Cytochrom c	1 %
	- Homogenat (1:30)	10 $\mu$ l, 20 $\mu$ l		
	- Messdauer: 180 s; $\lambda$ : 550 nm; $\epsilon$ : 21,1			

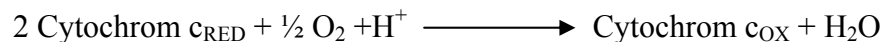
### 3.2.2.4 Komplex III



Gemessen wurde die an Komplex III katalysierte Reduktion von Cytochrom c durch Zugabe von Decylubichinol (reduziertes Coenzym Q). Da die Reaktion sehr empfindlich war, wurde das Homogenat in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben.

Testansatz:	Kalium-Phosphat-Puffer	1 M; pH 8,0	EDTA-Na	10 mM
	BSA	1 %	NaN <sub>3</sub>	0,1 M
	Cytochrom c	0,6 mM	Decylubichinol	10 mM
	- Homogenat (1:100)	5 µl, 10 µl, 20 µl		
	- Messdauer:	180 s; λ: 550 nm; ε: 21,1		

### 3.2.2.5 Cytochrom-c-Oxidase



COX katalysiert den Transfer von e<sup>-</sup> vom reduzierten Cytochrom c zum molekularen Sauerstoff. Dabei konnte die Abnahme von reduziertem Cytochrom c photometrisch bestimmt werden. Diese Reaktion ist ebenfalls sehr empfindlich, d.h. das Homogenat wurde 1:100 zugegeben.

Testansatz:	Kalium-Phosphat Puffer	0,1 M; pH 7,0
	Cytochrom c <sub>RED</sub>	60 µM (Herstellung erfolgte mittels SEPHADEX-Säule, Typ G-25, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
	- Homogenat (1:100)	10 µl, 20 µl
	- Messdauer:	120 s; λ: 550 nm; ε: 21,1

### 3.2.2.6 Citratsynthase



Gemessen wurde die Reduktion von DTNB gekoppelt an die Reduktion von CoA durch die Citratsynthasereaktion in Gegenwart von Oxalacetat. Das CoA bildet mit DTNB einen photometrisch detektierbaren Farbkomplex.

Testansatz:	Tris/Mannitol	50 mM Tris-HCl; pH = 7,4 / 200 mM Mannitol
	Triton	5 %
	DTNB	0,1 M in Tris-HCl; pH = 8,0
	Acetyl-CoA	50 mM in Tris-HCl; pH = 7,4

Oxalacetat	50 mM
- Homogenat (1:100)	5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l
- Messdauer: 220 s; $\lambda$ : 412 nm; $\epsilon$ : 13,6	

### 3.2.2.7 Bestimmung von Nichtkollagen-Protein

Zur Trennung des NCP vom Kollagen-Protein wurden 10  $\mu$ l Homogenat (1:30) mit 90  $\mu$ l 50 mM NaOH versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kollagen-Protein 10 min mit einer Beckman Microfuge E<sup>TM</sup> (Beckman Coulter, Unterschleißheim) abzentrifugiert (Lilienthal *et al.*, 1950). Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des BCA Assays<sup>1</sup> bei  $\lambda = 550$  nm (Standard: 0,1 % BSA) (Wiechelman *et al.*, 1988).

## 3.3 Isolierung von Nukleinsäuren

### 3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA der Proben erfolgte abhängig von der Probenmenge durch zwei unterschiedliche Methoden. Zum einen kamen die CsCl-Ultrazentrifugation (Chirgwin *et al.*, 1979) und für kleinere Probenmengen die Isolation mit dem RNeasy<sup>®</sup> Kit (Qiagen) zum Einsatz.

#### 3.3.1.1 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

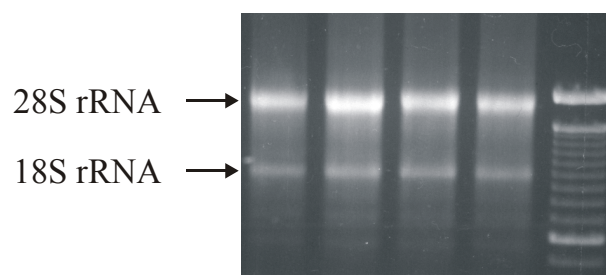
Die Muskelproben wurden nach ihrer Entnahme bis zu ihrer Weiterverwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die verwendeten Lösungen wurden über Nacht mit 0,01 % DEPC behandelt und autoklaviert bzw. steril mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt. Glasgeräte und Spatel wurden über Nacht bei 200 °C gebacken.

---

<sup>1</sup> BCA Assay: Bichinoninsäure Assay: Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch Proteine im alkalischen Milieu. Das reduzierte Kupfer bildet mit der Bichinoninsäure einen violetten Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. Da die Intensität der Farbstoffbildung temperaturabhängig ist, wird dieser Test im Photometer bei 56 °C durchgeführt.

<i>GTC-Lösung, pH 7,0</i>		<i>CsCl-Kissen, pH 6,5</i>		<i>TSPE-Puffer, pH 7,0</i>	
GTC	4 M	CsCl	5,7 M	Tris/HCl	10 mM
N-Lauroylsarcosine	1 %	Na-EDTA	100 mM	N-Lauroylsarcosine	1 %
Na-Acetat	25 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol	6 mM	Phenol	5 %
Na-EDTA	1 mM			Na-EDTA	1 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	1 M				

Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert, dann in GTC-Lösung (1 ml GTC-Lösung pro 100 mg Gewebe) überführt und mit einem Ultra-Turrax (IKA-Werke, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 10 min bei  $3000 \text{ min}^{-1}$ , RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig auf ein CsCl-Kissen (2,6 ml), welches in einem Zentrifugenröhrchen (12 ml Tube PA, Sorvall, Newtown, USA) vorgelegt wurde, geschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $33.000 \text{ min}^{-1}$ , 21 h (Rotor: TH-641 Sorvall). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und der Boden des Zentrifugenröhrchens, in dem sich das RNA-Pellet befand, abgetrennt. Das Pellet wurde in 400  $\mu\text{l}$  TSPE-Puffer gelöst und in ein Greiner-Röhrchen überführt. Die RNA wurde mit 0,1 Vol 3 M Na-Acetat, pH 6,0 und 8 ml 96 % Ethanol über Nacht bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  präzipitiert. Am folgenden Tag wurde sie 30 min bei  $10.000 \text{ min}^{-1}$ ,  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$  abzentrifugiert (Rotor: HB-6 Sorvall), 2x mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Vor der Lagerung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  erfolgte noch eine Konzentrationsbestimmung (unter 3.4.1 beschrieben) und ein Aliquot wurde zur Kontrolle in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4: Gelelektrophorese von RNA:** Die hochreine RNA ist frei von DNA-Kontaminationen und Abbauprozessen. Deutlich erkennbar sind die Banden für 28- und 18S rRNA.

### 3.3.1.2 RNeasy<sup>®</sup> Kit (Qiagen)

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus kleineren Probenmengen wurden die Gewebe wie unter 3.3.1.1 beschrieben mit Hilfe eines Ultra-Turrax im Lysepuffer aufgeschlossen und

entsprechend dem Standardprotokoll des RNeasy<sup>®</sup> MIDI/MINI Kits (Qiagen, Hilden) verarbeitet. Zur Entfernung genomischer DNA wurden die Proben zusätzlich in den Zentrifugier-säulchen mit DNase I für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss an die Waschschrirte erfolgte die Aufnahme der RNA in 200/50  $\mu$ l Wasser und die o.g. Kontrollschritte.

### 3.3.2 Isolierung von Gesamt-DNA

Zur Präparation von Gesamt-DNA wurde der Puregene Kit (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) verwendet. Die Proben (5-10 mg) wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 300  $\mu$ l Lysepuffer aufgenommen. Das Homogenat wurde mit einem Mikropistill nochmals zerkleinert und mit 2,52  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) über Nacht bei 55  $^{\circ}$ C inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte eine RNase-Behandlung von 30 min bei 37  $^{\circ}$ C. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Proteinprazipitationslosung wurde 20 s gevortext und 5 min bei 14.000  $\text{min}^{-1}$  zentrifugiert. In ein neues Tube wurden 300  $\mu$ l Isopropanol vorgelegt und der Überstand dazupipettiert. Die ausgefallene DNA wurde 30 min, 14.000  $\text{min}^{-1}$  bei 4  $^{\circ}$ C abzentrifugiert, 2x mit 70 % Ethanol gewaschen und 15 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde über Nacht bei RT in 100  $\mu$ l DNA-Hydratationslosung gelöst und anschließend eine Konzentrationsbestimmung (3.4.1) durchgeführt.

### 3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

#### 3.3.3.1 Kultivierung der Bakterien

Die benutzten *E. coli*-Stämme wurden bei 37  $^{\circ}$ C über Nacht in LB-Flüssigmedium bei 200  $\text{min}^{-1}$  oder auf LB-Agarplatten (LB-Agar: Invitrogen, Karlsruhe) angezogen. Antibiotika wurden entsprechend eingesetzt (Ampicillin: 100  $\mu$ g/ml; Kanamycin: 50  $\mu$ g/ml).

#### 3.3.3.2 Isolation von Plasmiden

Mit Hilfe des JETQUICK Plasmid Spin Kits (Genomed, Bad Oeynhausen) wurden aus 2 ml einer Bakterienkultur Plasmide entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Diese hochreine Plasmid-DNA konnte für die schnelle Überprüfung von Klonierungen, Restriktionsanalysen und Sequenzierungsreaktionen verwendet werden. Zur Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden 25 ml einer Bakterienkultur mittels des Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verarbeitet.

### 3.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 3.4.1 Bestimmung der Konzentration

Zur Bestimmung der Qualität und Quantität der RNA- und DNA-Proben, wurden diese geeignet verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Für die Berechnung der Konzentration gelten folgende Beziehungen:

$$1 A_{260}\text{-Einheit} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$$

$$1 A_{260}\text{-Einheit} = 40 \mu\text{g RNA/ml.}$$

Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt über Verunreinigungen mit Proteinen Auskunft (1,7 – 2,0).

#### 3.4.2 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA oder RNA erfolgte mit den Gelelektrophorese-Systemen von MWG-Biotech (Ebersberg). 1 % w/v Agarose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in 1x TBE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde Ethidiumbromid zugesetzt (1  $\mu\text{l}$  /100 ml) und die Lösung in die Gelkammer gegossen. Den Proben wurde vor dem Auftragen 1/10 Volumen Probenpuffer zugesetzt und die aufgetragenen Proben bei 8-10 V/cm Laufstrecke getrennt (Laufpuffer 1x TBE) (Sambrook *et al.*, 1989). Die Länge der Fragmente wurde mit Hilfe parallel mitgeführter Längenstandards (100 bp-Leiter, 1 kb-Leiter; Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt. Im Anschluss wurden die Gele zur Dokumentation fotografiert (Polaroid Film 665, Polaroid GmbH, Offenbach).

<i>1x TBE-Puffer</i>		<i>10x Probenpuffer</i>		<i>TE-Puffer</i>	
Tris	89 mM	Glycerol	50 %	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
Borsäure	89 mM	Bromphenolblau	0,25 %	Na-EDTA	1 mM
Na-EDTA	2,5 mM	in TE-Puffer			

#### 3.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

##### 3.4.3.1 Elektroelution von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung in einem möglichst

kleinen Stück aus dem Gel geschnitten. Diese Agaroseblöcke wurden in zuvor in TBE-Puffer äquilibrierte Dialyseschläuche (Spectra/Por<sup>®</sup> Membrane, MWCO 1000, Spectrum Medical Industries, California, USA) überführt und an einem Ende mit einem Clip versehen. Nach Zugabe von 500 µl 1x TE-Puffer wurde der Schlauch luftblasenfrei mit einem weiteren Clip verschlossen. Die Schläuche wurden quer in eine Gelkammer eingelegt und die DNA ca. 20 min bei 120 - 130 V in den Puffer überführt. Danach wurde die Spannung einige Sekunden umgepolt, um die DNA von der Membran zu lösen. Nach positiver Kontrolle auf dem UV-Tisch wurde der Puffer entnommen und die DNA nach Zugabe von 1/10 Vol 3 M Na-Acetat und 0,7 Vol Isopropanol über Nacht gefällt und 30 min bei 14.000 min<sup>-1</sup>, 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

#### 3.4.3.2 JETQUICK Gel Spin Kit

Alternativ kam der JETQUICK Gel Spin Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) zum Einsatz. Hier wurden die aus dem Gel geschnittenen Agaroseblöcke entsprechend den Angaben des Herstellers aufgearbeitet und die DNA in 50 µl Wasser aufgenommen.

#### 3.4.4 Restriktionsansätze

Die Restriktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 2 U Restriktionsenzym pro µg DNA über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Dabei kamen kommerziell erhältliche Enzyme mit den dazugehörigen Reaktionspuffern zum Einsatz. Eine Zwischenüberprüfung einer kleinen Probe des Restriktionsansatzes erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Abschließend wurde der gesamte Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente wie unter 3.4.3 beschrieben eluiert und ihre Konzentration bestimmt.

#### 3.4.5 Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Für die Quantifizierung bestimmter spezifischer mRNAs in der Gesamt-RNA wurde die RT-PCR (Köhler *et al.*, 1995) eingesetzt. Dabei wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und durch anschließende Amplifikation mittels PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen.

##### 3.4.5.1 RT-Ansatz

Die nachfolgenden Arbeiten wurden absolut RNase-frei unter Verwendung von DEPC-Wasser durchgeführt. Für einen 25 µl Ansatz wurden 100 - 250 ng Gesamt-RNA (ad 10 µl

DEPC H<sub>2</sub>O) bei 72 °C für 3 min denaturiert (Auflösen von Sekundärstrukturen der RNA) und auf 4 °C abgekühlt. Anschließend wurde auf Eis folgender RT-Mix dazu pipettiert:

5 µl	5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe)
1 µl	12,5 mM dNTP (Amersham Biosciences, Freiburg)
3 µl	random primer (100 ng/µl) (Invitrogen, Karlsruhe)
2,5 µl	DTT (10 mM)
0,5 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl) RNaseOUT™ (Invitrogen, Karlsruhe)
0,5 µl	SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200 U/µl) (Invitrogen, Karlsruhe)
ad 25 µl	DEPC H <sub>2</sub> O

Dieser Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen) bei 42 °C für 35 min inkubiert, dann 1 min bei 95 °C denaturiert und bei -20 °C gelagert. Der so gewonnene RT-Ansatz diente bei der nachfolgenden PCR als Template.

#### 3.4.5.2 PCR-Ansatz

2,5 µl	10x PCR-Buffer (Amersham Biosciences, Freiburg)
3 µl	100 µM dNTP (Amersham Biosciences, Freiburg)
1 µl	Sense Primer (10 pmol/µl) (MWG-Biotech, Ebersberg)
1 µl	Antisense Primer (10 pmol/µl) (MWG-Biotech, Ebersberg)
0,2 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl) (Amersham Biosciences, Freiburg)
2 µl	RT-Ansatz
Ad 25 µl	DEPC H <sub>2</sub> O

Der 25 µl Ansatz wurde auf Eis pipettiert, mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet, gemischt und kurz anzentrifugiert. Die nachfolgende PCR-Amplifikation wurde in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt.

1. Schritt	Denaturierung	95 °C	3 min	} x Zyklen
2. Schritt	Denaturierung	95 °C	30 s	
3. Schritt	Primer-Annealing	T <sub>a</sub> °C	30 s	
4. Schritt	DNA-Synthese	72 °C	30 s	
5. Schritt	abschließende DNA-Synthese	72 °C	5 min	
6. Schritt		4 °C	~	



Die Annealingtemperatur ( $T_a$ ) in Schritt 3 ist abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der eingesetzten Primer. Diese wurde für jedes Primerpaar bestimmt (vgl. Tabelle 3-4).

Name	Primer	Sequenzen (5' → 3')	Fragmentgröße [bp]	$T_a$ [°C]	Zyklen	AccNr.
rat mt	S	ACC GCG GTC ATA CGA TTA AC	400	60	24	X14848
12S rRNA	AS	TGC CTT TTT AGG GTT TGC TG				
rat mt	S	ACA GTA GGG GGC CTA ACA GG	402	60	24	X14848
COX1	AS	CAC TTC TCG TTT TGA TGC GA				
rat mt	S	GTC TAG GGT TGG CGT TGA AG	422	60	24	X14848
ND6	AS	CCC AGC CAC CAC TAT CAT TC				
rat F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -	S	TTA TCC CCC GAA TCT CTG TG	418	60	28	J05266
ATPase $\alpha$	AS	GCC TGC TTG GAT AAG TCG TC				

**Tabelle 3-4: Eingesetzte Primer und Reaktionsbedingungen für die kompetitive standardkalibrierte RT-PCR:** Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe der Onlineschnittstelle „Primer3 Input“ des Whitehead Institute Center for Genome Research ([http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)).

Die Anzahl der Zyklen wurde durch Tests dahingehend optimiert, um nicht in die Plateauphase der Amplifikation zu gelangen (Köhler *et al.*, 1995). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie unter 3.4.2 angegeben gelelektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert.

### 3.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reaktion erfolgte wie unter 3.4.5.2 beschrieben, jedoch wurde hier anstelle des RT-Ansatzes genomische DNA oder Plasmid-DNA als Template verwendet.

### 3.4.7 Automatische DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle der PCR-Produkte oder einer erfolgreichen Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide erfolgte eine DNA-Sequenzierung mit dem Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Freiburg). Diesem liegt eine Kombination aus der Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) und der PCR zugrunde.

Die zu sequenzierenden Fragmente wurden zuvor durch eine Agarosegelelektrophorese gereinigt, aus dem Gel isoliert und 2  $\mu$ g DNA davon verwendet. Der Sequenzierungsansatz enthielt weiterhin 8  $\mu$ l Premix aus dem o.g. Kit (incl. Sequenase) und 1  $\mu$ l des spezifischen sense oder antisense Primers (10 pmol/ $\mu$ l). Der Ansatz wurde auf 20  $\mu$ l mit Wasser aufgefüllt und mit

zwei Tropfen Mineralöl überschichtet. In einem MiniCycler™ (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) wurden 30 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil gefahren: 96 °C 30 s (Denaturierung), 45 °C 15 s (Primer-Annealing), 60 °C 4 min (DNA-Synthese). Nach dem Abkühlen wurden die Ansätze in ein neues Tube überführt und mit 7 µl (7,5 M) NH<sub>4</sub>-Acetat und 2,5 Vol Ethanol 96 % auf Eis gefällt und 40 min bei 4 °C 14.000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Die präzipitierten Nukleinsäurefragmente wurden 2x mit Ethanol gewaschen, das Pellet 10 min getrocknet und in 4 µl Loading Dye aufgenommen. Im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erfolgte die elektrophoretische Trennung der Proben sowie die automatische Auswertung der Sequenzierreaktion mit einem ABI Prism 373 DNA-Sequencer (Perkin Elmer, Weiterstadt; Dr. G. Kaltenborn). Die vergleichende Kontrolle der Nukleotidsequenzen mit Genbanken erfolgte online durch das BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

### 3.5 Kompetitive standardkalibrierte RT-PCR

Die mRNA-Expressionsuntersuchungen der mitochondrialen Gene wurden mit Hilfe der kompetitiven standardkalibrierten RT-PCR durchgeführt. Diese Methode ist in ihrer Vorbereitung und Durchführung sehr aufwendig, erlaubt jedoch die Bestimmung der Molekülzahlen spezifischer mRNAs auch gering exprimierter Gene in der Gesamt-RNA durch die Zugabe eines internen cDNA-Standards (Köhler *et al.*, 1995).

Die Abbildung 3-5 erklärt den Versuchsaufbau und -ablauf. Für die kompetitive standardkalibrierte RT-PCR benötigt man 4 - 5 RT-Ansätze jeder zu bestimmenden Probe, welche jeweils die gleiche Menge an Gesamt-cDNA enthalten. Diesen wird neben den normalen Komponenten der PCR weiterhin je ein DNA-Standard (3.5.1) definierter Verdünnungsstufe mit bekannter Molekülzahl zugesetzt.

Während der PCR-Reaktionen kompetieren die cDNA-Moleküle des Target mit den DNA-Molekülen des Standards um die eingesetzten Primer, da sie identische Primerbindungsstellen besitzen. Mit zunehmender Standardkonzentration wird das Targetfragment schwächer amplifiziert. Die PCR-Ansätze werden abschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, fotografiert und densitometrisch ausgewertet.

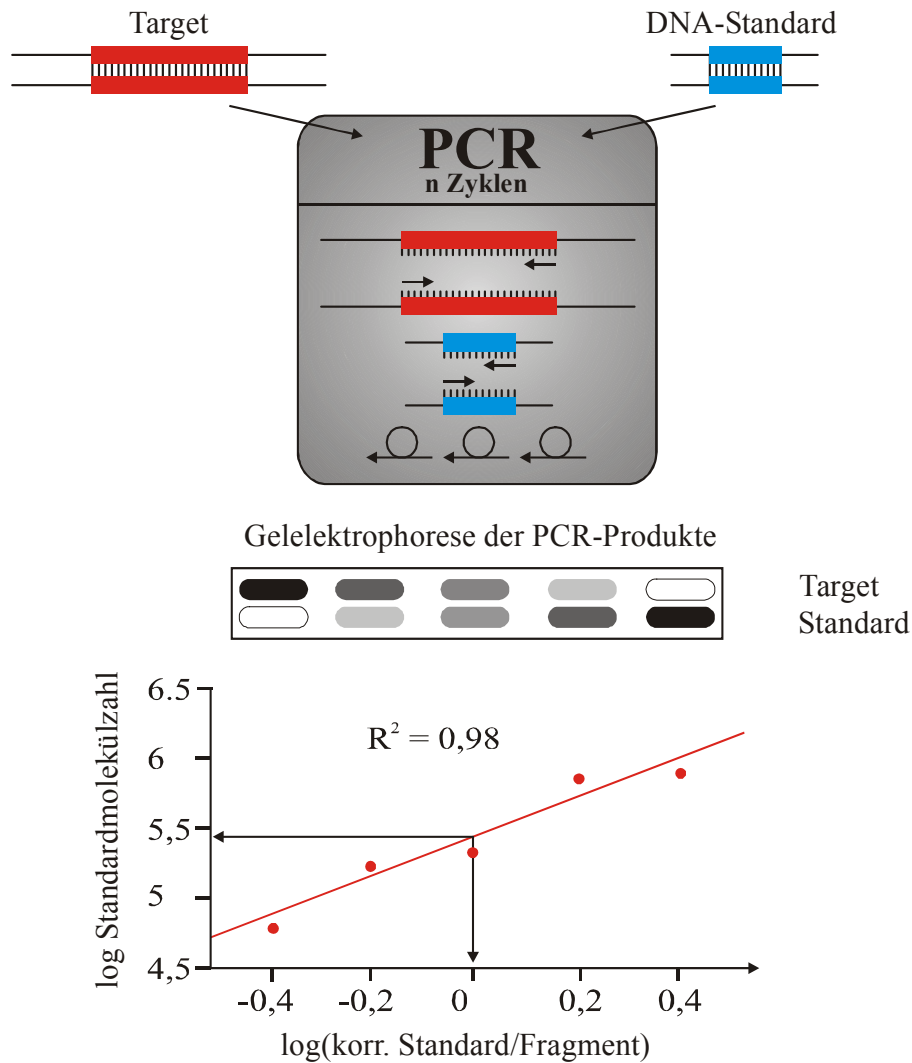


Abbildung 3-5: Übersicht über die Teilschritte der kompetitiven standardkalibrierten RT-PCR.

### 3.5.1 Herstellung des DNA-Standards

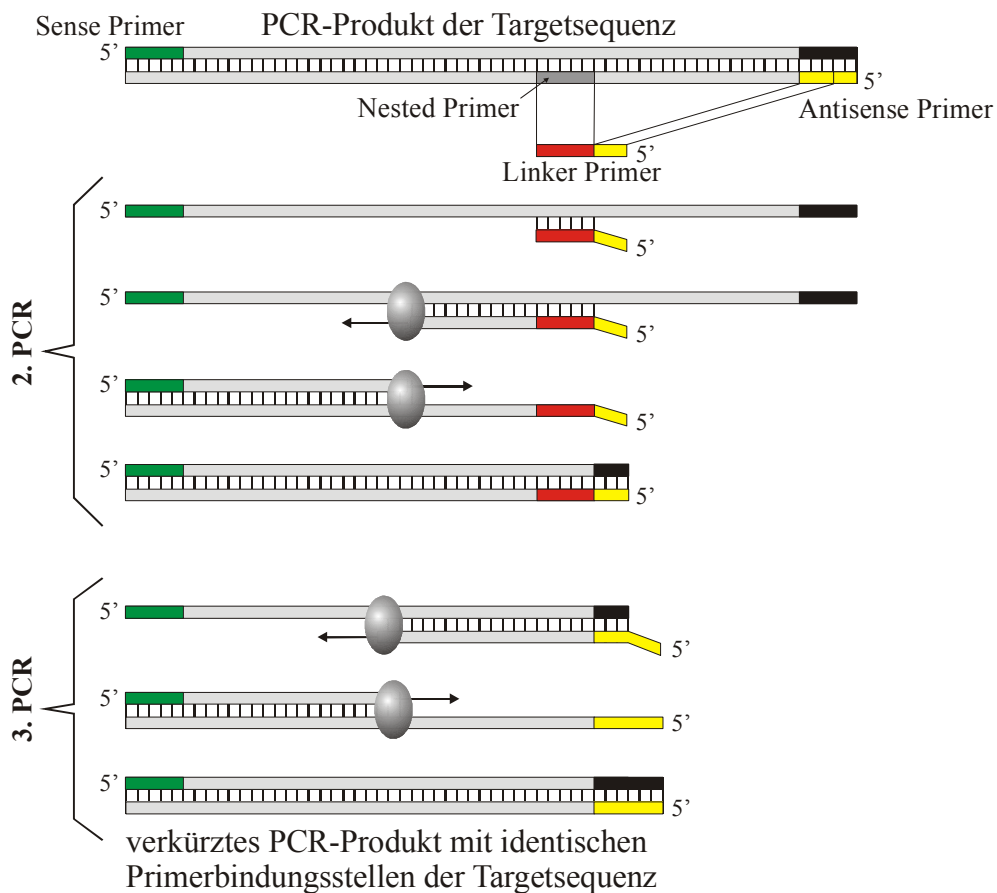
Die für die kompetitive standardkalibrierte RT-PCR benötigten verkürzten DNA-Standards wurden in drei PCR-Schritten nach einer Methode von Förster (Förster, 1994) hergestellt, indem das spezifische PCR-Fragment durch eine interne Deletion um ca. 150 – 200 bp verkürzt wurde, ohne die flankierenden Primersequenzen zu verändern.

Nach Durchführung einer RT-PCR mit den spezifischen Primern entnimmt man dem Tube 15 µl Reaktionsprodukt und stellt daraus eine 1:500 Verdünnung her. Diese dient in der 2. PCR als Template, wobei man hier anstelle des Antisense Primers einen Linker Primer einsetzt. Er setzt sich aus ca. 10 b des 3'-Endes des Antisense Primers und ca. 20 b der Deletion folgenden Sequenz (Nested Primer) zusammen (Tabelle 3-5). Das entstandene verkürzte PCR-Produkt wurde wiederum verdünnt und in einer 3. PCR mit den spezifischen Primern

(Sense und Antisense) amplifiziert. Hierbei entstand ein definiert verkürztes Fragment mit exakt den gleichen Primerbindungsstellen wie die Originalsequenz (vgl. Abbildung 3-6).

Name	Sequenzen (5' → 3')	Target [bp]	Standard [bp]	Korrekturfaktor
rat mt 12S rRNA	GGG TTT GCT GGG CAA ATA ATT TTG TAG	400	262	1,53
rat mt COX1	TTT GAT GCG AGG AAA AAA TGT TAT GTT TAC	402	256	1,57
rat mt ND6	CAC TAT CAT TCC TCC ATA AAA AGC CCT AAA AC	422	271	1,56
rat F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> - ATPase $\alpha$	GAT AAG TCG TCC ACC AAC TGA GCA ACG GTG G	418	265	1,58

**Tabelle 3-5: Sequenzen der Linker Primer:** Länge der Target- und Standardfragmente und der zur anschließenden Auswertung der densitometrischen Daten erforderliche Korrekturfaktor (gelb markiert: Teil der Sequenz des Antisense Primers; rot: Sequenz nach der Verkürzungsstelle; siehe Abbildung 3-6)



**Abbildung 3-6: Teilschritte zur Herstellung des verkürzten internen DNA-Standards.**

Die Intensität der Standardbande im Agarosegel bei gleicher molarer Konzentration ist jedoch geringer als die der Targetbande, da in das kürzere Fragment weniger Ethidiumbromid interkalieren kann. Bei der Auswertung wurden deshalb die Intensitäten der Standardbanden mit einem Korrekturfaktor multipliziert, der sich aus den Längenverhältnissen Target/Standard ergibt.

### 3.5.1.1 Klonierung der Standard-DNA-Fragmente

Zur Klonierung der verkürzten Standard-DNA wurde der TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Das frische PCR-Produkt wurde entsprechend der Vorschrift mit dem pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Vektor versetzt, leicht gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die entsprechenden kompetenten Bakterien des Kits (*E. coli* TOP10F') wurden im Moment des Auftauens mit 2 µl Klonierungsansatz vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch 30 s Hitzeschock im 42 °C Wasserbad beendet und anschließend erfolgte eine 30 s Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 300 µl LB Medium wurde das Tube horizontal 1 h geschüttelt (120 min<sup>-1</sup>, 37 °C) und anschließend 3 verschiedene Mengen (10 µl, 70 µl, 170 µl) auf LB-Platten mit Ampicillin/Kanamycin (je 50 µg/ml), die mit je 40 µl IPTG (20 mg/ml) und X-Gal (20 mg/ml DMSO) beschichtet wurden, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### 3.5.1.2 Selektion positiver Klone

Die Selektion positiver Klone erfolgte nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) durch Blau-Weiß-Screening. Je 10 weiße Klone und 1 blauer Klon (Negativkontrolle) wurden einzeln in 500 µl LB (100 µg/ml Ampicillin) 5 h bei 37 °C und 200 min<sup>-1</sup> kultiviert.

Die Suche nach dem Insert des Plasmids erfolgte durch den PCR-Schnelltest. Dazu wurden von jeder Kultur 100 µl abgenommen, 2 min bei 14.000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und 5 min bei 95 °C im Thermoblock gekocht, anschließend 5 min 14.000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und der Überstand als Template für eine PCR mit den spezifischen Primern verwendet. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Ansätze zeigten die positiven Klone ein PCR-Fragment in der entsprechenden Größe (siehe Tabelle 3-5).

Von 2 - 3 positiven Klonen wurden die Plasmide isoliert (3.3.3.2) und mit M13-Primern sequenziert (3.4.7), deren Bindungsstellen jeweils *up-* bzw. *downstream* der Klonierungsstelle

liegen. Von den positiven Klonen wurden weiterhin Glycerinstocks (300 µl Bakteriensuspension und 300 ml 50 % Glycerol) zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

### 3.5.1.3 Berechnung der Molekülzahl der Standard-DNA-Fragmente

Aus den isolierten Plasmiden wurde das klonierte Standardinsert herausgeschnitten (vgl. 3.4.4), der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und das DNA-Fragment isoliert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung konnte die Anzahl der Standard-DNA-Moleküle mit nachfolgender Formel berechnet werden:

$$x = \frac{A_{260} \cdot V_F \cdot N_A}{n_A \cdot A_A + n_T \cdot A_T + n_G \cdot A_G + n_C \cdot A_C}$$

$x$	Molekülzahl pro l
$A_{260}$	UV-Lichtabsorption bei 260 nm
$V_F$	Verdünnungsfaktor
$N_A$	AVOGADRO-Konstante ( $N_A = 6,0221367 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
$n_A, n_T, n_G, n_C$	Anzahl der jeweiligen Nukleotide des DNA-Fragments
$A_A, A_T, A_G, A_C$	Absorptionskoeffizient der jeweiligen Nukleotide

### 3.5.2 Bestimmung der geeigneten Standardkonzentrationen für die kompetitive RT-PCR

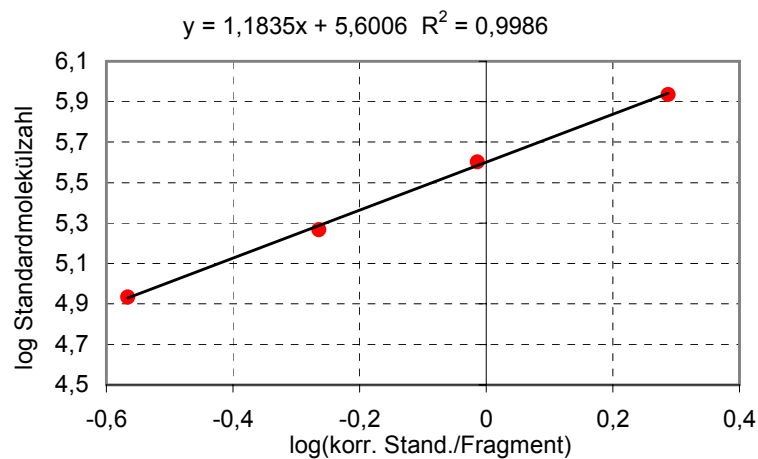
Zur Bestimmung des optimalen Bereiches um den Äquivalenzpunkt, an dem gleiche Molekülzahlen von Target und Standard in einem PCR-Ansatz vorliegen sollten, wurden 4 – 5 gleiche PCR-Ansätze mit normalen RTs mit dem in 10er Schritten verdünnten DNA-Standard versetzt. Über die Auswertung des Gels (Abbildung 3-5) war es nun möglich den Äquivalenzpunkt genau zu definieren und die 4 – 5 Verdünnungsstufen des DNA-Standards logarithmisch um diesen Punkt zu verteilen. Die entsprechenden Verdünnungsreihen wurden für jedes Gen hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.5.3 Durchführung und Auswertung der standardkalibrierten RT-PCR

Für die Analyse der einzelnen Gene wurden jeweils 4 – 5 Ansätze pipettiert, welche die gleiche Menge an RT-Ansatz (cDNA der zu untersuchenden mRNA) und unterschiedliche Mole-

külzahlen an DNA-Standard enthielten. Nach erfolgter Amplifizierung in der PCR (siehe 3.4.5) wurden die Proben in der Gelelektrophorese aufgetrennt und fotografiert. Die Negative der Polaroidaufnahmen wurden mit einem Durchlichtscanner (Umax Astra 1200S, Umax Systems GmbH, Willich) digitalisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Aida (Raytest, Straubenhardt). Die Intensitäten der Banden wurden über ihre Flächenintegrale logarithmisch aufgetragen (Abbildung 3-7).

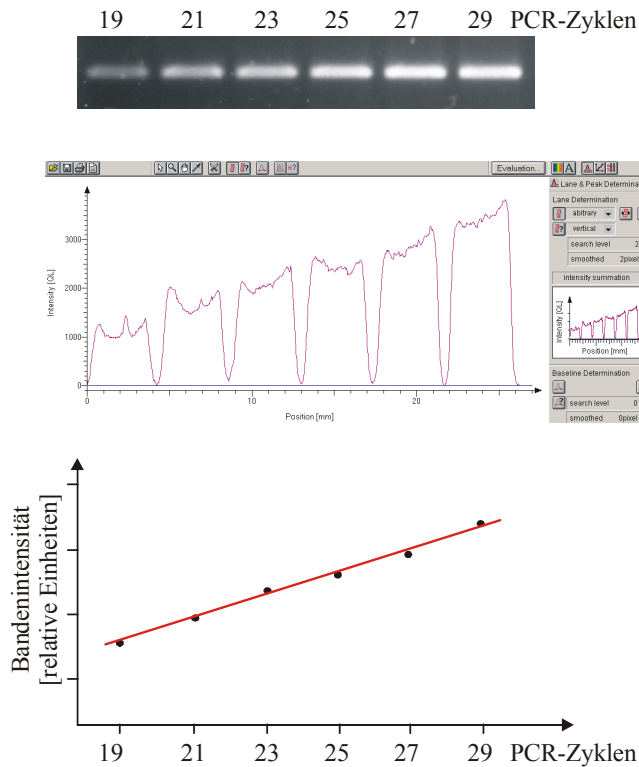
Die Molekülzahl des DNA-Standards (doppelsträngig) musste vorher verzweifacht werden, da er gegenüber der RT (Hybridmolekül aus mRNA und cDNA) in der PCR entsprechend im Vorteil war. Nun ließ sich sowohl graphisch als auch durch mathematische Berechnungen der Äquivalenzpunkt bestimmen, an dem die Konzentrationen von Target und Standard im PCR-Ansatz identisch waren. Damit konnte die ursprünglich im RT-Ansatz vorhandene Menge an Target-RNA ermittelt werden



**Abbildung 3-7: Graphische Auswertung der kompetitiven standardkalibrierten RT-PCR.**

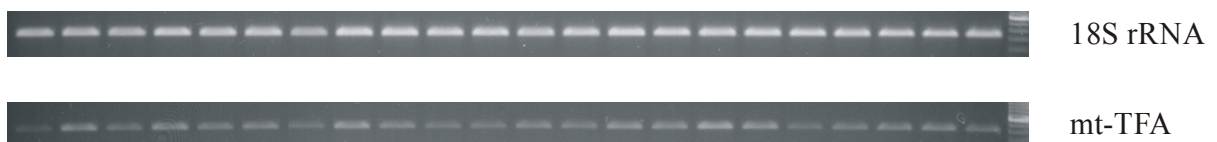
### 3.6 Semiquantitative RT-PCR

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Genexpression ist die semiquantitative RT-PCR. Hierbei werden die zu untersuchenden Gene mit einem so genannten *House-Keeping-Gene* abgeglichen. Dabei handelt es sich um Gene (18S rRNA, GAPDH), die in unterschiedlichen Spezies und Geweben exprimiert sind, aber unter verschiedenen physiologischen Bedingungen nicht reguliert, sondern konstant exprimiert werden.



**Abbildung 3-8: Beispiel zur Bestimmung der Zyklenzahl für die semiquantitative RT-PCR.**

Von den unter 3.4.5.1 hergestellten RTs wurden mit den spezifischen Primern von 18S rRNA bzw. GAPDH PCRs gefahren, um den Einsatz gleicher Mengen an Gesamt-RNA und die Regelmäßigkeit der RT zu überprüfen. Die Ermittlung der geeigneten Zyklenzahl erfolgte wie in Abbildung 3-8 dargestellt, um nicht in die Plateauphase der PCR zu gelangen. Im Anschluss wurde von den zu untersuchenden Proben unter identischen Bedingungen (PCR-Ansatz, Thermoblock, PCR-Programm, Gelelektrophorese) die PCR durchgeführt, die Negative der Agarosegele gescannt und ausgewertet (Abbildung 3-9). Die Intensitäten der Banden wurden über ihre Flächenintegrale erfasst. Jede Probe konnte mit dem Wert des *House-Keeping-Genes* normalisiert werden und ein Vergleich der Proben untereinander war möglich.



**Abbildung 3-9: Nachweis und semiquantitative Bestimmung der mRNA-Expression am Beispiel von mtTFA:** In der oberen Bahn sind die gleichmäßigen Banden des *House-Keeping-Genes* (18S rRNA), in der unteren Bahn die unterschiedlich starke Expression des mtTFA der einzelnen Proben deutlich erkennbar.

#### A. Zyklentest

Ein identischer PCR-Ansatz wurde in verschiedenen Zyklen amplifiziert und geelektrophoretisch aufgetrennt.

#### B. Densitometrische Auswertung

Bestimmung der Intensität der DNA-Banden.

#### C. Graphische Auswertung

Die Plateauphase der PCR wurde noch nicht erreicht, da eine lineare Beziehung zwischen Bandenintensität und Zyklenzahl vorliegt.



Name	Primer	Sequenzen (5' → 3')	Fragm.-größe [bp]	T <sub>a</sub> [°C]	Zyklus	AccNr.
GAPDH	S	CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG	ca. 400	60	23	J02642
	AS	TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG				
18S rRNA	S	GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G	ca. 400	60	13	V01270
	AS	AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C				
rat mt TFA	S	AAA ATT GCA GCC ATG TGG AG	421	60	29	AB014089
	AS	CCA TTT GCT CTT CCC AAG AC				
hum 16S rRNA	S	AAG CGT TCA AGC TCA ACA CC	398	60	16	J01415
	AS	CTA CCT TTG CAC GGT TAG GG				
hum COX1	S	CTC CTA CTC CTG CTC GCA TC	402	60	16	NC_001807
	AS	TTC AGG GTG ACC GAA AAA TC				
hum ND6	S	CCC CGA GCA ATC TCA ATT AC	424	60	16	NC_001807
	AS	TGA TTG TTA GCG GTG TGG TC				
hum MnSOD	S	CTC CCG ACC TGC CCT ACG ACT AC	374	64	26	Y00985
	AS	AAA CCA AGC CAA CCC CAA CCT GAG				

**Tabelle 3-6: Eingesetzte Primer und Reaktionsbedingungen für die semiquantitative PCR:** Die Primer für die GAPDH und die 18S rRNA sind für verschiedene Spezies spezifisch und ergeben jeweils ein Fragment gleicher Größe. Das Design der Primer erfolgte auch hier mit Hilfe der Online-schnittstelle „Primer3 Input“ des Whitehead Institute Center for Genome Research.

### 3.7 Southern-Blot-Analysen

Zur Quantifizierung der mitochondrialen DNA wurden Southern-Blot Analysen (Southern, 1975) durchgeführt. Als Sonden kamen PCR-Fragmente der humanen mitochondrialen 16S rRNA und der nukleären 18S rRNA zum Einsatz (vgl. Tabelle 3-6). Beide wurden mit dem DIG DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers markiert. Nach *random priming* konnten während einer PCR durch *Klenow*-Polymerase DIG-11-dUTP (alkali labil) Nukleotide in den komplementären Strang synthetisiert werden.

#### 3.7.1 Vorbereitung der Proben

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus den Myokardproben erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben. Um die circulaire mitochondriale DNA zu linearisieren wurde ein Restriktionsverdau mit Apa I (bzw. Bam HI, Pvu II) über Nacht bei 30 °C (bzw. 37 °C) durchgeführt, die DNA mit

Isopropanol präzipitiert, 2x mit 70 % Ethanol gewaschen, das Pellet 10 min luftgetrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Die 20 µl DNA wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt und zusammen mit 2 µl 1-kb-Marker (Boehringer Marker X; Boehringer, Mannheim) und 2 µl λ-DNA-HindIII-Marker (Boehringer Marker II; Boehringer, Mannheim) auf einem 0,8 %igen Agarosegel bei 30 V über Nacht aufgetrennt.

### 3.7.2 Blotten

Am nächsten Tag wurde das Gel 15 min in 0,25 M HCl (Depurinierung), 2 x 15 min in Denaturierungslösung (Auftrennen der Doppelstränge) und 30 min in Neutralisationslösung gelagert. Eine Wanne wurde mit 20x SSC Transferpuffer gefüllt und eine Glasplatte aufgelegt.

<i>Denaturierungslösung</i>	<i>Neutralisationslösung, pH 7,5</i>	<i>20x SSC Transferpuffer, pH 7,0</i>
0,5 M NaOH	0,5 M Tris	3 M NaCl
1,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,3 M NaCitrat

Auf diese Glasplatte wurden 3 Lagen mit Transferpuffer befeuchtetes Whatman-Papier luftblasenfrei aufgebracht, wobei die Enden der untersten längeren Lage in die Wanne hingen. Das Gel wurde kurz in Transferpuffer gewaschen, mit den Slots nach unten aufgelegt und mit einer Rolle luftblasenfrei festgedrückt. Eine mit Transferpuffer benetzte Hybond™-N+ Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde auf das Gel gelegt und mit drei Lagen Whatman-Papier abgedeckt. Abschließend wurden die Seiten der Glasplatte getrocknet, mit Parafilm abgedeckt und ca. 10 cm Zellstofflagen aufgelegt. In diesem Kapillarblot wurde nach Beschwerden mit einem 1 kg Gewicht über Nacht geblottet.

### 3.7.3 Hybridisierung

Am nächsten Tag wurde die Membran zur Fixierung der DNA 2 h bei 80 °C gebacken. Ein Stück Gaze wurde in der Größe der Membran zurechtgeschnitten und gemeinsam mit der Membran in 2x SSC getränkt, beide luftblasenfrei zusammen aufgerollt und in die Hybridisierungsflasche geschoben. Durch vorsichtiges Rollen und Schütteln wurden Gaze und Membran gegen die Innenseite der Flasche luftblasenfrei abgerollt. Das Netz sorgte dafür, dass die Hybridisierungsflüssigkeit gleichmäßigen Zugang zu allen Bereichen der Membran bekam

und wirkte in den überlappenden Membranbereichen als Spacer und verhinderte somit Hintergrundprobleme. Nach Zugabe von 30 ml auf 42 °C vorgewärmter Hybridisierungslösung wurde 50 min bei 42 °C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Ein Mix aus 25 µl Sonde, 1,5 µl 1kb-Marker und 2,5 λ-DNA-HINDIII (alle DIG-11-dUTP gelabelt, vgl. 3.7) wurde 5 min gekocht, 5 min auf Eis abgekühlt und zur Hybridisierungslösung und Membran hinzugeben. Anschließend wurde über Nacht bei 42 °C hybridisiert.

*Hybridisierungslösung, pH 7,0*

SSC	5x	NaP	50 mM
SDS	0,1 %	hsDNA	100 µg/ml
Denhardt	5x		

### 3.7.4 Waschen und Detektion

Der Nachweis des Hybrids erfolgte immunologisch mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durch eine mit Anti-Digoxigenin gekoppelte alkalische Phosphatase und CSPD als Substrat.

*Waschpuffer I*

*(Low Stringency)*

- 10 ml 20x SSC
- 1 ml 10 % SDS
- 89 ml Wasser

*Waschpuffer II*

*(High Stringency)*

- 2,5 ml 20x SSC
- 1 ml 10 % SDS
- 96,5 ml Wasser

*Waschpuffer III*

*(Maleinsäure)*

- 0,1 M Maleinsäure
- 0,15 M NaCl
- 0,3 % (v/v) Tween 20
- pH 7,5

*1x Blocking Solution 300 ml*

- nach Herstellerangaben

*Antikörperlösung 50 ml*

- Anti-DIG-AP 5 min
- 10.000 min<sup>-1</sup> zentrifugieren
- von Oberfläche 5 µl abpipettieren + 50 ml 1x Blocking Solution

*Detektionspuffer*

- 0,1 M Tris-HCl
- 0,1 M NaCl
- pH 9,5

*CSPD (ready to use) 10 ml*

- 100 µl CSPD (Vial 5)
- 9,5 ml Detektionspuffer

Die Membran wurde 2x 5 min im Waschpuffer I bei RT, 2x 15 min im Waschpuffer II bei 65 °C und 5 min in Waschpuffer III bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran 30 min in 100 ml 1x Blocking Solution inkubiert. Daran schlossen sich 30 min in 20 ml Anti-

körperlösung und 2x 15 min in 100 ml Waschpuffer III an. Die gewaschene Membran wurde 5 min in 20 ml Detektionspuffer befeuchtet, dann 4 ml CSPD (*ready to use*) über die Membran verteilt und ohne Luftblasen in Haushaltsfolie eingeschlagen. Nach 5 min RT wurde überschüssige Flüssigkeit herausgepresst und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 15 - 20 min wurde die Membran fotografiert (Scientific Imaging Film BioMax MR 13x18 cm, Kodak, Stuttgart).

### 3.8 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden als arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms MS Excel. Signifikanzanalysen wurden mit dem t-Test durchgeführt.

Werte von  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen und sind im Folgenden mit \* gekennzeichnet; Werte von  $p \leq 0,01$  wurden als hochsignifikant angesehen und sind mit \*\* gekennzeichnet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Mikrorespirometrische Untersuchungen

Funktionell gesehen ist die quergestreifte Arbeitsmuskulatur je nach Aufgabe zu unterschiedlichen Anteilen aus drei verschiedenen Muskelfasertypen aufgebaut. Diese Fasertypen können anhand ihres Stoffwechsels (mit der entsprechenden Enzymausstattung) und ihrer Kontraktibilität unterschieden werden (Lindholm *et al.*, 1974)<sup>1</sup>. Unter Berücksichtigung dieser Charakterisierung (s.u.) wurden für die Untersuchungen Typ-I-Fasern (rote Fasern) verwendet.

Die Ratten der Versuchsreihe stammten aus Experimenten im Institut für Umwelttoxikologie, bei denen die protektive, antiapoptotische und antioxidative Rolle von Coenzym Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) in Zellmembranen (intramembranäres Redoxcycling) und in der inneren Mitochondrienmembran gegenüber Radikalbildung am Komplex I der Atmungskette und der Atmungskettenkapazität untersucht wurde. Es gibt in extrakardialen Gewebe Hinweise, dass die Radikalbildung an Komplex I, welche die PTP-Öffnung (*permeability transition pore*) begünstigt, durch Coenzym Q<sub>10</sub> reguliert und gehemmt werden kann (Fontaine *et al.*, 1998). Im Altersherzen kann die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten und ihre Verteilung auf die verschiedenen Zellkompartimente gestört sein. Ein relativer Coenzym Q<sub>10</sub>-Mangel in der Zellmembran und/oder in der mitochondrialen Innenmembran kann ein Teil des Problems sein.

---

<sup>1</sup> 1. Typ-I-Fasern [ST-Fasern (Slow-twitch-Fasern), rote Fasern]: Diese relativ schmalen Fasern zeigen einen überwiegend oxidativen, d.h. aeroben Stoffwechsel. Demzufolge sind sie auch durch eine entsprechend ausgeprägte Gefäßversorgung, viele Mitochondrien und eine hohe Myoglobinkonzentration gekennzeichnet. Sowohl ihre Kontraktion als auch ihre Erschlaffung gehen relativ langsam vonstatten und sie sind sehr ermüdungsresistent. Sie sind verantwortlich für Ausdauer und Haltefunktion, z.B. M. soleus.

2. Typ-II-B-Fasern [FT-Fasern (Subtyp der Fast-twitch-Fasern), weiße Fasern]: Diese Fasern mit dem größten Faserquerschnitt gewinnen ihre Energie hauptsächlich auf anaerob-glykolytische Weise mit ausgeprägter Laktatbildung. Sie weisen eine geringe Kapillardichte, weniger Mitochondrien und eine niedrige Myoglobinkonzentration auf. Im Gegensatz zu den ST-Fasern kontrahieren und erschlaffen sie schnell und zeigen eine schnelle Ermüdbarkeit. Sie sind verantwortlich für die Schnellkraft, z.B. M. gastrocnemius.

3. Typ-II-A-Fasern [FTH-Fasern (Subtyp der Fast-twitch-Fasern)]: Dieser Typ wird auch als Intermediärtyp bezeichnet, da diese Fasern sowohl eine hohe glykolytische als auch eine oxidative Enzymaktivität besitzen. Sie können also aerobe und auch anaerobe Arbeit leisten. Sie weisen eine schnelle Kontraktions- und Erschlaffungsfähigkeit auf, zeigen jedoch eine relative Ermüdungsresistenz. Ihr Faserquerschnitt liegt zwischen dem der beiden zuvor genannten.

Umgekehrt kann man schlussfolgern, dass exogene Coenzym Q<sub>10</sub>-Substitution über einen protektiven Effekt in den beiden genannten Membrankompartimentierungen eine gestörte Anpassungsreaktion des Altersherzens insgesamt verbessert.

Die 24 Monate alten Ratten wurden im Institut für Umwelttoxikologie jeweils 21 Tage mit einer wasserlöslichen Nanodispersion von CoQ<sub>10</sub> (2 mg/kg/d subkutan, abdominal) (MSE Pharmazeutika, Bad Homburg) behandelt. Um einen reibungslosen Ablauf der sich anschließenden umfangreichen Arbeiten zu gewährleisten, erfolgte diese Behandlung gestaffelt über einen Zeitraum von 37 Tagen. Dadurch konnten die zeitaufwendigen Präparationen und Organentnahmen jeweils an einer kleinen Gruppe von behandelten Tieren vorgenommen werden. Die Kontrolltiere wurden mit NaCl<sub>phys.</sub> scheinbehandelt. Die vier Monate alten Ratten wurden nur scheinbehandelt und als Kontrolle bzw. zum Vergleich jung vs. alt verwendet. Hier erfolgte keine Gabe von CoQ<sub>10</sub>, da in den jungen Tieren keine Veränderungen der CoQ<sub>10</sub>-Spiegel erwartet wurden. Das Gewicht der jungen Tiere betrug  $348 \pm 7$  g, das der alten Tiere  $389 \pm 10$  g ( $p = 0,032$ ). Nach Abschluss der CoQ<sub>10</sub>-Behandlung wurden die Tiere (nachfolgend als Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten bezeichnet) getötet und ein Teil des linken Ventrikels und des M. soleus unverzüglich in kalten Storagepuffer überführt. Der verbleibende Teil des linken Ventrikels und des M. soleus wurden in flüssigem Stickstoff zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Organ	junge Ratten (Kontrolle)	alte Ratten (Kontrolle)	alte Ratten (CoQ <sub>10</sub> )
linker Ventrikel	$24,65 \pm 0,85$	$27,2 \pm 2,17$	$25,29 \pm 2,32$
rechter Ventrikel	$26,21 \pm 2,11$	$32,6 \pm 2,45$	$27,30 \pm 1,86$
Skelettmuskel	$2,97 \pm 0,38$	$3,27 \pm 0,56$	$2,76 \pm 0,57$
Leber	$11,46 \pm 0,61$	** $31,00 \pm 5,70$	** $161,10 \pm 44,38$

**Tabelle 4-1: CoQ<sub>10</sub>-Gehalte in verschiedenen Organen der untersuchten Ratten:** Die Bestimmung des CoQ<sub>10</sub>-Gehaltes erfolgte durch HPLC-DAD<sup>2</sup> (Messung durch: FILT Lungen- und Thoraxdiagnostik GmbH, Berlin). Die Werte sind als [ $\mu\text{g CoQ}_{10}/\text{g Organgewicht}$ ]  $\pm$  SEM angegeben.

<sup>2</sup> Die Organproben wurden vollständig eingewogen und im Umlufttrockenschrank bei 37 °C bis zur Massekonstanz (mindestens jedoch 48 Stunden) getrocknet und die Trockensubstanz bestimmt. Die getrockneten Proben wurden verrieben und 3x 30 min im Ultraschallbad mit n-Hexan/Ethanol extrahiert. Die Extrakte wurden unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Reagentalkohol/Methanol aufgenommen und mittels High Pressure Liquid Chromatography - Diode Array Detection untersucht.

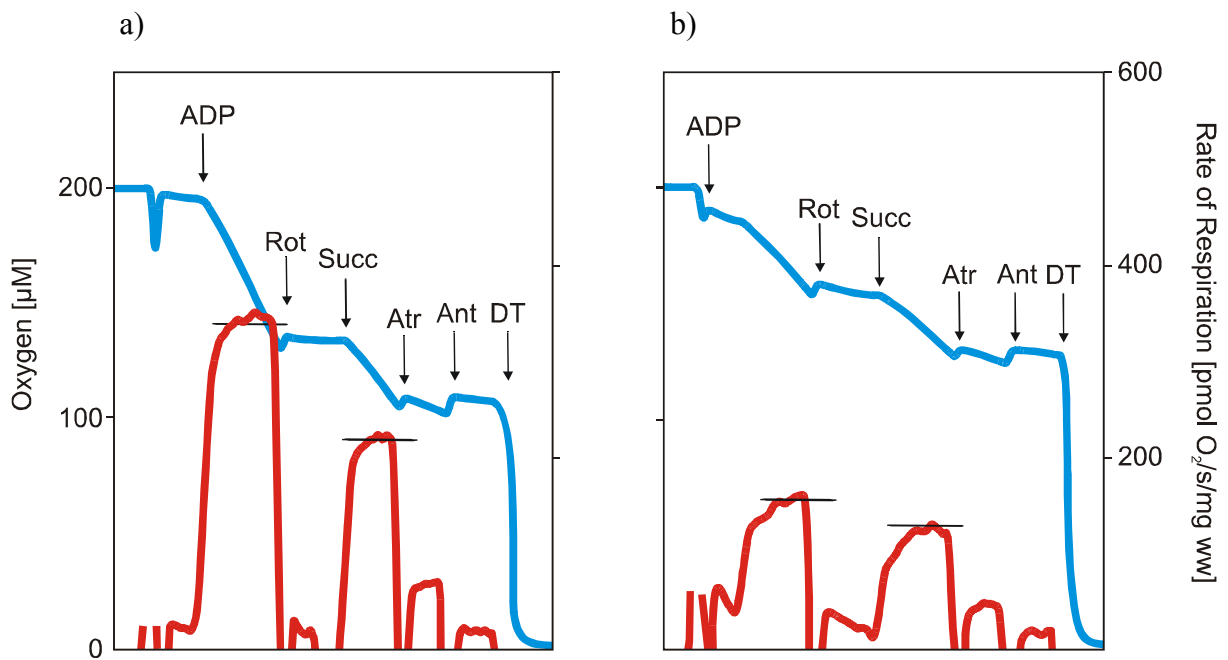
Die subkutane Applikation von CoQ<sub>10</sub> führte bei senilen Ratten zu keiner Erhöhung der endogenen CoQ<sub>10</sub>-Gehalte in Herz- und Skelettmuskulatur (Tabelle 4-1). In der Leber wurden sowohl in den alten Kontrolltieren, als auch nach Gabe von CoQ<sub>10</sub> hochsignifikant größere CoQ<sub>10</sub>-Gehalte gemessen. Daraus war zu schlussfolgern, dass in alten Ratten der CoQ<sub>10</sub>-Gehalt durch diese Art der Applikation von CoQ<sub>10</sub> nicht verändert werden konnte. Der Anstieg der Werte in der Leber spiegelt den Abbau des im Überschuss zugeführten CoQ<sub>10</sub> wieder und lässt nicht auf Veränderungen zellulärer Schutzmechanismen schließen (Müller *et al.*, 2001).

Für die weiterführenden Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit (Mikrorespirometrie, Enzymaktivitäten und Genexpression), stellte das Institut für Umwelttoxikologie aus der Gesamtzahl der untersuchten Tiere folgende Proben zur Verfügung.

4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	n = 6
24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	n = 6
24 Monate	Gabe von CoQ <sub>10</sub>	n = 10

Aufgrund der begrenzten Menge des Probenmaterials aus dem Myokard konnten von 5 Tieren (vgl. Tabelle 7-1 im Anhang) keine mikrorespirometrischen Untersuchungen durchgeführt werden. Die Zahl der alten Tiere verringerte sich somit auf n = 11, die der jungen Tiere blieb dagegen konstant bei n = 6. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten wurden auch bei der Untersuchung des M. soleus die o.g. Tiere aus dem Experiment herausgenommen.

Bei der Messung wurden die Daten wie folgt erfasst. Die zwei offenen Messkammern wurden mit Inkubationsmedium gefüllt und das Medium bei eingeschaltetem Magnetrührer belüftet. Die Sättigung mit Luftsauerstoff war nach wenigen Minuten an einer konstanten Sauerstoffkonzentration erkennbar. Als Substratlösungen wurden 10 mM Pyruvat und 2 mM Malat in die Messkammer pipettiert. Die Messkammer wurde nach dem Einbringen der Muskelfaser verschlossen und nach der Registrierung des Sauerstoffverbrauchs in Gegenwart der Substrate ohne ADP (*State 2*-Atmung) wurde 5 mM ADP zugesetzt. Der als P/M+ADP erfasste Messwert stellt die Maximalatmung (*State 3*) dar und wird nachfolgend als Pyruvatatmung dargestellt. Nach einer kurzen stationären Phase erfolgte die Zugabe von 5 µM Rotenon zur Hemmung von Komplex I. Die verbleibende Atmungsaktivität stellt die Rotenon-insensitive Atmung dar (vgl. Abbildung 4-1).

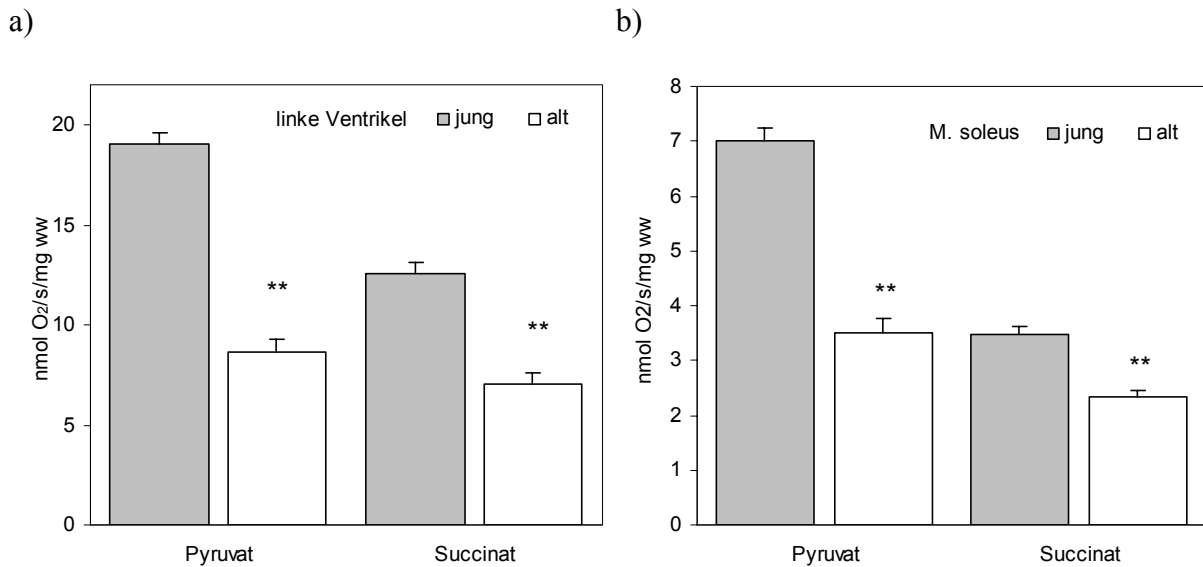


**Abbildung 4-1: repräsentatives Diagramm eines Kurvenverlaufs der mikrorespirometrischen Untersuchungen an Geweben von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** a) zeigt einen typischen Kurvenverlauf bei der Untersuchung von permeabilisierten Muskelfasern junger Tiere; b) zeigt den Kurvenverlauf in senilen Tieren. Die Messungen erfolgten im Oxygraphen Oroboros<sup>®</sup> mit dazugehöriger Analysesoftware. Die blaue Kurve gibt die jeweilige Sauerstoffkonzentration wieder, die Atmungsgeschwindigkeit als erste Ableitung der Sauerstoffkonzentration ist in der roten Kurve dargestellt. (Rot = Rotenon / Succ = Succinat / Atr = Atractylat / Ant = Antimycin A / DT = Dithionit)

Durch die Zugabe von 10 mM Succinat wird die Succinat-abhängige Atmung aktiviert und die Atmung über den Komplex II kann untersucht werden. Die Aktivität von Komplex II ist im Allgemeinen geringer als die *State 3*-Atmung. Aufgrund der hohen ATP-Konzentration im Oxygraphen kann kein normaler Übergang von der *State 3* zur *State 4*-Atmung in der Muskelfaser beobachtet werden. Aus diesem Grund wird durch die Gabe von 50 µM Atractylat der Adenin-Nucleotid-Translokator gehemmt und es ist die *State 4*-Atmung messbar. Diese enthält neben dem Leak auch noch den extramitochondrialen oder nichtenzymatischen Sauerstoffverbrauch in der Muskelfaser. Der nächste Messwert wird nach Zugabe von 10 µM Antimycin A erfasst, das die Atmungskette an Komplex III durch Unterbrechung des Elektronentransportes stoppt. Der Wert für das Leak spiegelt die Differenz zwischen Antimycin-resistenter Atmung und *State 4*-Atmung wieder. Die Experimente wurden durch Zugabe von Dithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) als Reduktionsmittel beendet und die Sauerstoffkalibrierung (Nullwert) vorgenommen.



Sowohl in den Proben des linken Ventrikels als auch im M. soleus der Versuchstiere zeigte sich generell eine starke Erniedrigung der Atmungsraten um ca. 50 % der senilen Tiere im Vergleich zu den jungen Tieren (Abbildung 4-2). Eine Übersicht der Einzelergebnisse zeigt Tabelle 7-1 im Anhang.



	linke Ventrikel		M. soleus	
	Pyruvat	Succinat	Pyruvat	Succinat
jung	19,02 ± 0,67	12,58 ± 0,56	6,99 ± 0,26	3,47 ± 0,14
alt	** 8,67 ± 0,60	** 7,03 ± 0,54	** 3,50 ± 0,26	** 2,33 ± 0,12

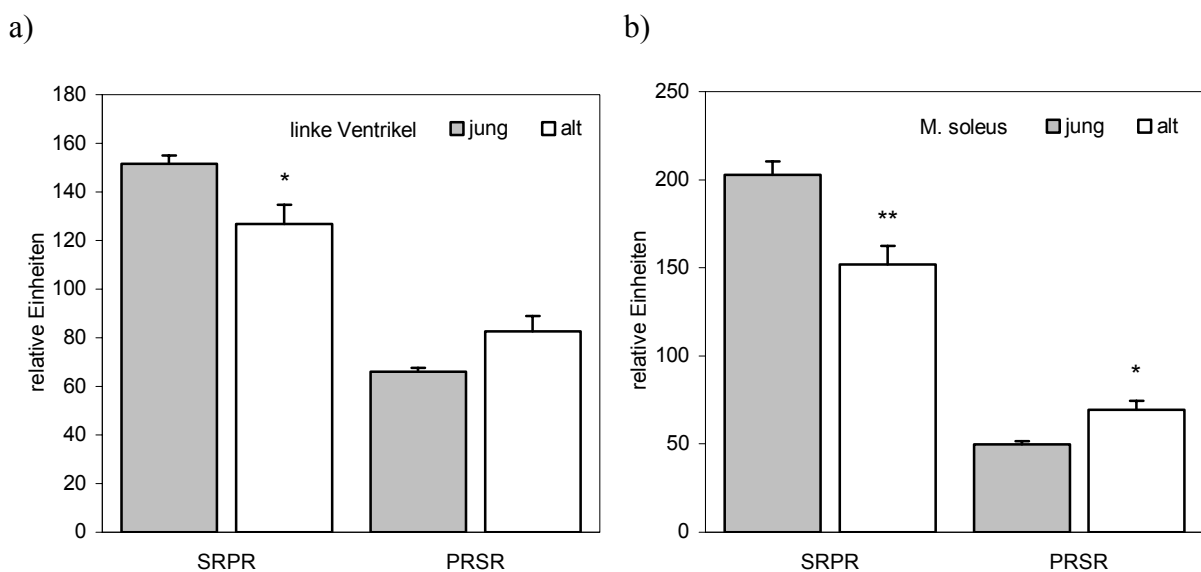
**Abbildung 4-2: Darstellung der Ergebnisse der mikrorespirometrischen Untersuchungen junger und alter Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** a) Ergebnisse der Untersuchungen des linken Ventrikels; b) Ergebnisse der Untersuchungen des M. soleus. Die Werte sind als [nmol O<sub>2</sub>/s/mg ww] ± SEM angegeben. (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 11)

Die Untersuchungen der Mikrorespirometrie der Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten ergaben hochsignifikante Änderungen sowohl in den Geweben des linken Ventrikels als auch im M. soleus (Abbildung 4-2). So war die Maximalatmung (*State 3*) im Alter im linken Ventrikel um 54,39 % ( $p < 0,001$ ) und im M. soleus um 49,88 % ( $p < 0,001$ ) erniedrigt. Nach Hemmung von Komplex I durch Rotenon und Zugabe von Succinat war auch die Atmung über Komplex II im linken Ventrikel um 44,12 % ( $p < 0,001$ ) und im M. soleus der alten Tiere um 32,75 % ( $p < 0,001$ ) hochsignifikant erniedrigt.

In den Myokardproben (Abbildung 4-2a) konnten generell weitaus höhere Werte als im M. soleus (Abbildung 4-2b) der gleichen Tiere ermittelt werden. Dieser Umstand lässt sich durch die wesentlich größere Anzahl an Mitochondrien im Herzmuskel erklären (Kardiomyozyten ca. 30 %, Skelettmuskel ca. 3-5 % des Zellvolumens).

Die Bildung des Verhältnisses der Messwerte von Komplex I zu Komplex II ermöglichte, die SRPR (*Succinat Related Pyruvat Respiration*) zu ermitteln, bei der die Untersuchungsergebnisse auf die Succinatatmung abgeglichen werden und eine Detektion von Komplex I-abhängigen funktionellen Veränderungen möglich ist. Dieser von der Mitochondrienmenge unabhängige Parameter ermöglicht somit eine direkte Identifizierung von Defekten des Komplexes I (Abbildung 4-3).

Weiterhin konnte die PRSR (*Pyruvat Related Succinat Respiration*) bestimmt werden, bei der auf Pyruvat normiert wird. Diese Verhältnisse geben Aufschluss über die Atmungskapazitäten der einzelnen Komplexe unabhängig von der gesamten Atmungsaktivität und lassen Rückschlüsse auf ihre Aktivitäten im Verhältnis von Komplex I zu Komplex II zu.



	linke Ventrikel		M. soleus	
	SRPR	PRSR	SRPR	PRSR
jung	151,68 ± 3,31	66,09 ± 1,46	202,63 ± 7,71	49,74 ± 2,02
alt	* 126,76 ± 8,01	82,72 ± 6,34	** 151,71 ± 10,56	* 69,32 ± 5,01

**Abbildung 4-3: Ergebnisse der Bestimmungen der Quotienten aus Succinat- und Pyruvatatmung:** a) Quotienten der Atmungsaktivitäten im linken Ventrikel; b) Quotienten der Atmungsaktivitäten im M. soleus; Alle Werte sind als relative Einheiten ± SEM angegeben. (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 11)

Im linken Ventrikel der alten Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten war die SRPR um 16,43 % ( $p = 0,04$ ) erniedrigt, die PRSR entsprechend um 25,17 % ( $p = 0,07$ ) erhöht. Im M. soleus zeigten sich gleiche Tendenzen: SRPR war um 25,13 % ( $p = 0,005$ ) erniedrigt, PRSR um 39,37 % ( $p = 0,013$ ) erhöht (Abbildung 4-3).

Die Atmung über Komplex I ist also nicht nur generell im Alter signifikant erniedrigt, sondern zeigt auch im Verhältnis zu Komplex II, der nur aus kerncodierten Untereinheiten zusammengesetzt ist, eine signifikant niedrigere Atmung.

## **4.2 Enzymaktivitäten von Komplexen der Atmungskette**

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten der Komplexe der Atmungskette erfolgte in Geweben des linken Ventrikels und des M. soleus der unter 4.1 beschriebenen Tiere. Für Untersuchungen der Enzymaktivitäten der humanen Proben kamen linke Ventrikel zum Einsatz.

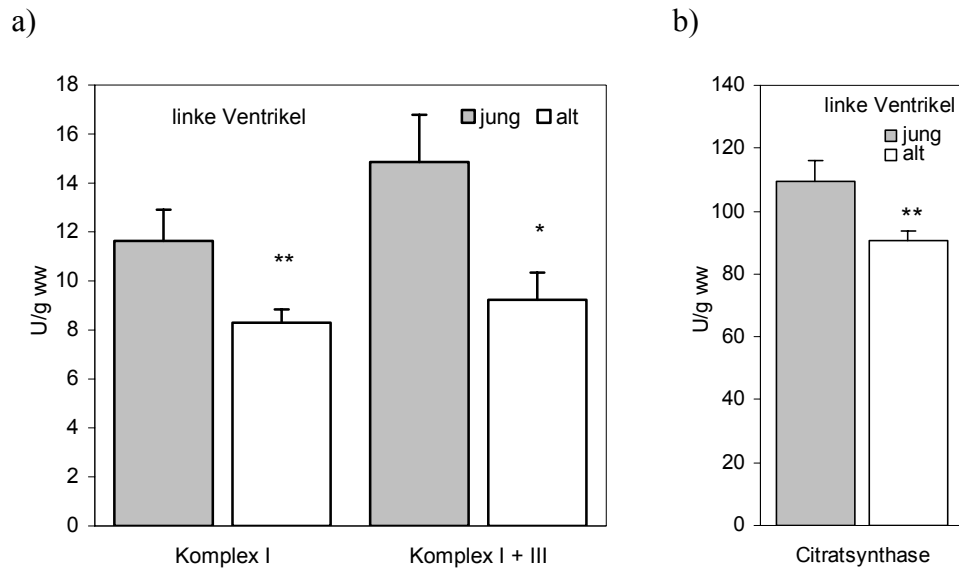
Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 3.2 beschrieben. Von den Proben wurden Komplex I (KI), Komplex I + III (KI + III), Komplex II + III (KII + III), Komplex III (KIII), Cytochrom-c-Oxidase (COX), Citratsynthase (CS) und Nichtkollagen-Protein (NCP) bestimmt. Der Abgleich der Messwerte erfolgte auf ww, CS und NCP (siehe 3.2.2).

### **4.2.1 Messung der Enzymaktivitäten von Atmungskettenkomplexen im Myokard von Ratten**

Die Auswertungen der Ergebnisse der Einzelgruppen konnten keine Effekte der Gabe von CoQ<sub>10</sub> auf die Enzymaktivität aufzeigen, so dass im Folgenden der Vergleich der jungen Tiere ( $n = 6$ ) mit den alten Tieren ( $n = 16$ ) dargestellt wird.

Bei der Untersuchung der Enzymaktivitäten (U/g ww) der Komplexe der Atmungskette in linken Ventrikeln von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten fand sich in den alten Tieren generell eine Erniedrigung im Vergleich zu den jungen Tieren (Abbildung 4-4).

Eine Zusammenstellung der Einzelergebnisse der Messung der Enzymaktivitäten von Atmungskettenkomplexen im Myokard von Ratten findet sich im Anhang in Tabelle 7-2.



	Komplex I	Komplex I + III	Citratsynthase
jung	11,64 ± 1,27	14,85 ± 1,93	109,34 ± 6,58
alt	** 8,30 ± 0,53	* 9,23 ± 1,11	** 90,60 ± 3,13

**Abbildung 4-4: Darstellung der Ergebnisse der Messung der Enzymaktivitäten in linken Ventrikeln junger und alter Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** a) Messergebnisse von Komplex I und Komplex I + III; b) Ergebnisse der Citratsynthase. Die Werte sind als U/g ww ± SEM angegeben. (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 16)

In den linken Ventrikeln alter Ratten waren die Enzymaktivitäten von Komplex I um 28,66 % ( $p = 0,0089$ ), Komplex I + III um 37,86 % ( $p = 0,017$ ) und der Citratsynthase um 17,14 % ( $p = 0,0088$ ) signifikant erniedrigt. Geringe Änderungen der Enzymaktivitäten fanden sich bei Komplex II + III (-15,00 %) sowie bei Komplex III (-5,58 %) und COX (-5,04 %). NCP war um 7,11 % vermindert (Abbildung 4-4). Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

	junge Tiere	alte Tiere	Änderung [%]
Komplex I ww	11,64 ± 1,27	8,30 ± 0,53	** -28,66
Komplex I / CS	10,83 ± 1,27	9,13 ± 0,44	-15,65
Komplex I / NCP	73,97 ± 7,54	56,92 ± 3,49	** -23,04
Komplex I + III ww	14,85 ± 1,93	9,23 ± 1,11	* -37,86
Komplex I + III / CS	13,56 ± 1,38	10,08 ± 1,08	-25,68

	junge Tiere	alte Tiere	Änderung [%]
Komplex I + III / NCP	94,56 ± 12,11	63,13 ± 7,12	* <b>-33,24</b>
Komplex II + III ww	13,43 ± 0,79	11,42 ± 0,88	-15,00
Komplex II + III / CS	12,39 ± 0,72	12,55 ± 0,83	1,27
Komplex II + III / NCP	85,92 ± 5,92	78,38 ± 5,75	-8,78
Komplex III ww	68,33 ± 6,09	64,52 ± 4,11	-5,58
Komplex III / CS	62,66 ± 4,38	72,14 ± 4,70	15,14
Komplex III / NCP	437,30 ± 41,21	443,21 ± 27,07	1,35
COX ww	40,88 ± 6,47	38,82 ± 2,95	-5,04
COX / CS	37,18 ± 5,25	43,26 ± 3,09	16,36
COX / NCP	261,38 ± 41,23	264,82 ± 17,49	1,31
Citratsynthase ww	109,34 ± 6,58	90,60 ± 3,13	** <b>-17,14</b>
Citratsynthase / NCP	694,90 ± 36,32	624,61 ± 23,77	-10,12
NCP	157,17 ± 4,03	145,99 ± 3,22	-7,11

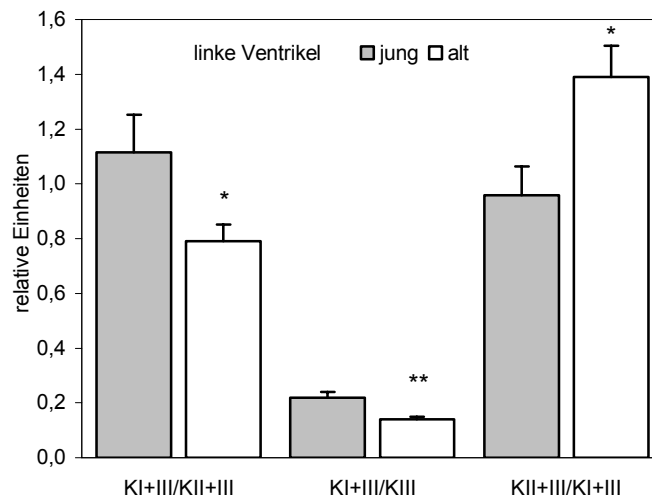
**Tabelle 4-2: Zusammenstellung der Ergebnisse der Bestimmung der Enzymaktivitäten von Komplexen der Atmungskette in linken Ventrikeln von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Die Enzymaktivitäten für die Feuchtgewichte (ww) sind in U/g ww angegeben. Die Angaben für die Normierungen auf CS und NCP erfolgen als relative Einheiten. Signifikante Änderungen sind folgendermaßen gekennzeichnet: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 16)

Um die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe untereinander und unabhängig von den generellen Verringerungen (ww, CS, NCP) zu betrachten, wurden folgende Quotienten gebildet und ausgewertet:

- KI + III/KII + III      SRNO (*Succinat Related NADH+H<sup>+</sup> Oxidation*)
- KI + III/KIII          KIII-RNO (*KIII Related NADH+H<sup>+</sup> Oxidation*)
- KII + III/KI + III

Nach Abgleich der Messwerte von KI + III auf die Messwerte von KII + III, ist es möglich, eine direkte Aussage über die Enzymaktivitäten der Komplexe I und II untereinander zu treffen. So war der Komplex I in den alten Tieren im Verhältnis zu Komplex II signifikant erniedrigt. Dies bestätigte auch ein Abgleich auf Komplex III, bei dem sich das gleiche Verhältnis zeigte. Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich, wenn man die Daten auf KI + III bezieht (KII + III/KI + III). Diese Variante einer vergleichenden Darstellung bietet eine weitere Möglichkeit zur Vorstellung der Ergebnisse der Enzymaktivitäten. Im oben gezeigten Fall

ist erkennbar, dass der nur aus kerncodierten Untereinheiten bestehende Komplex II im Verhältnis zu Komplex I eine relativ höhere Enzymaktivität aufweist. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abbildung 4-5 zusammengefasst.



	KI + III/KII + III	KI + III/KIII	KII + III/KI + III
jung	1,12 ± 0,14	0,22 ± 0,02	0,96 ± 0,10
alt	* 0,79 ± 0,06	** 0,14 ± 0,12	* 1,39 ± 0,11

**Abbildung 4-5: Graphische und tabellarische Darstellung der Quotienten der Enzymaktivitäten in linken Ventrikeln junger und alter Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Die Werte sind als relative Einheiten ± SEM angegeben. (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 16)

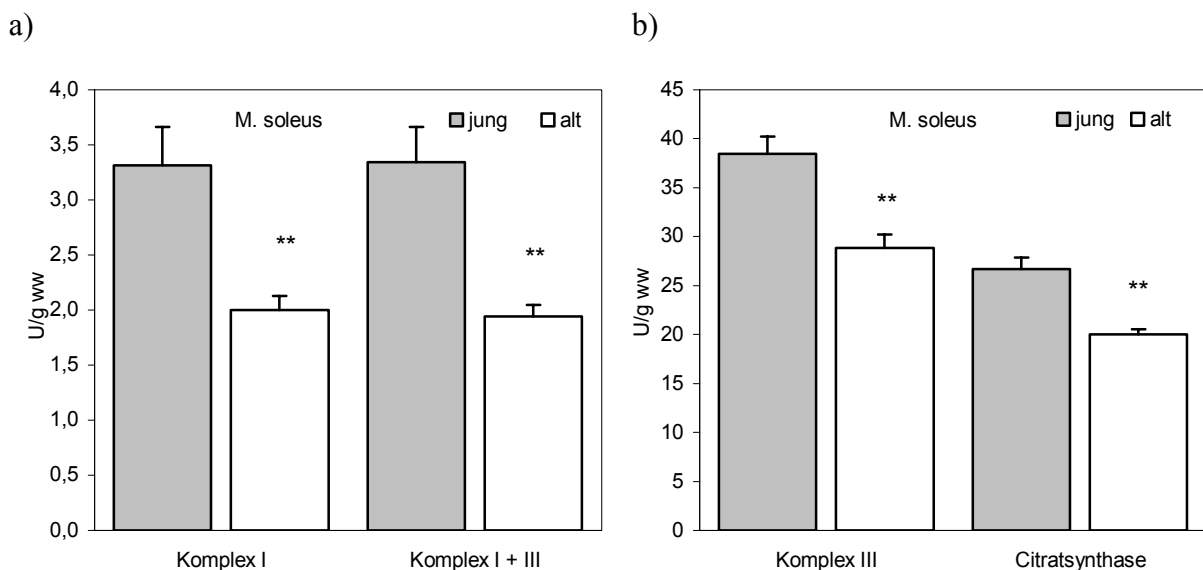
Die Auswertung ergab bei den alten Ratten eine signifikante Erniedrigung der SRNO um 29,18 % ( $p = 0,019$ ) sowie eine hochsignifikante Erniedrigung der KIII-RNO von 36,78 % ( $p = 0,002$ ). Weiterhin ergab sich ein signifikanter Anstieg von KII + III/KI + III um 45,04 % ( $p = 0,039$ ) (Abbildung 4-5).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den Messungen der Enzymaktivitäten von Atmungskettenkomplexen im Myokard alter Ratten eine generelle Erniedrigung der Aktivitäten von Komplex I sowie Komplex I + III festzustellen war. Dies war einerseits durch eine verringerte Anzahl Mitochondrien zu erklären, wie die Auswertung der Citratsynthaseaktivität zeigte. Betrachtet man jedoch die von Mitochondrienzahl und ww unabhängigen Quotienten SRNO sowie KIII-RNO, so zeigte sich andererseits, dass dieses Komplex I-Defizit nicht ausschließlich auf eine Verringerung der Mitochondrienzahl zurückzuführen ist.

#### 4.2.2 Messung der Enzymaktivitäten im M. soleus von Ratten

Mangels Probenmaterial aus dem M. soleus konnten bei 4 Tieren (siehe Tabelle 7-2 im Anhang) keine Untersuchungen durchgeführt werden. Die Zahl der alten Tiere verringerte sich somit auf  $n = 12$ , die der jungen Tiere bleibt konstant bei  $n = 6$ .

Auch in den Geweben des M. soleus von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten fanden sich bei der Untersuchung der Enzymaktivitäten (U/g ww) der Komplexe der Atmungskette in den alten Tieren generell Erniedrigungen im Vergleich zu den jungen Tieren (Einzelergebnisse Tabelle 7-2 im Anhang).



	Komplex I	Komplex I + III	Komplex III	Citratsynthase
jung	3,32 ± 0,34	3,34 ± 0,32	38,49 ± 1,76	26,68 ± 1,15
alt	** 2,00 ± 0,13	** 1,94 ± 0,10	** 28,84 ± 1,36	** 19,99 ± 0,57

**Abbildung 4-6: Ergebnisse der Messung der Enzymaktivitäten im M. soleus junger und alter Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Die Werte sind als U/g ww ± SEM angegeben. (junge Tiere  $n = 6$ , alte Tiere  $n = 12$ )

Die Messungen ergaben hochsignifikant erniedrigte Enzymaktivitäten in den Proben des M. soleus alter Ratten. So waren Komplex I um 39,65 % ( $p < 0,001$ ), Komplex II + III um 41,90 % ( $p < 0,001$ ), Komplex III um 25,07 % ( $p < 0,001$ ) und die Citratsynthase um 25,07 % ( $p < 0,001$ ) erniedrigt (Abbildung 4-6). NCP war um 6,16 % erhöht. Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

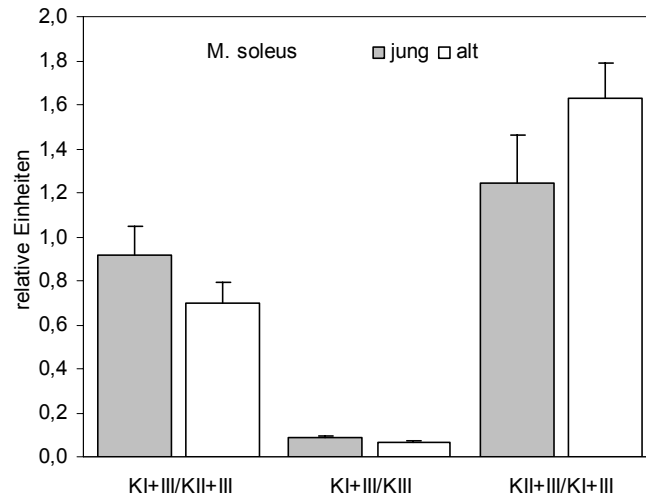
	junge Tiere	alte Tiere	Änderung [%]
Komplex I ww	3,32 ± 0,34	2,00 ± 0,13	** -39,65
Komplex I / CS	12,51 ± 1,27	10,05 ± 0,60	-19,66
Komplex I / NCP	35,04 ± 2,77	20,73 ± 1,64	** -40,82
Komplex I + III ww	3,34 ± 0,32	1,94 ± 0,10	** -41,90
Komplex I + III / CS	12,64 ± 1,23	9,82 ± 0,62	* -22,32
Komplex I + III / NCP	36,16 ± 4,27	19,91 ± 1,27	** -44,95
Komplex II + III ww	3,88 ± 0,36	3,08 ± 0,27	-20,66
Komplex II + III / CS	14,39 ± 0,88	15,14 ± 0,99	5,20
Komplex II + III / NCP	41,83 ± 4,49	31,94 ± 3,09	-23,63
Komplex III ww	38,49 ± 1,76	28,84 ± 1,36	** -25,07
Komplex III / CS	144,47 ± 3,71	144,17 ± 5,01	-0,21
Komplex III / NCP	417,90 ± 37,17	298,37 ± 20,13	** -28,60
COX ww	21,31 ± 2,94	16,10 ± 1,12	-24,46
COX / CS	78,46 ± 9,54	80,16 ± 4,99	2,17
COX / NCP	228,59 ± 32,79	164,45 ± 12,30	* -28,06
Citratsynthase ww	26,68 ± 1,15	19,99 ± 0,57	** -25,07
Citratsynthase / NCP	288,61 ± 21,93	205,84 ± 10,06	** -28,68
NCP	93,70 ± 4,06	99,47 ± 5,01	6,16

**Tabelle 4-3: Zusammenstellung der Ergebnisse der Bestimmung der Enzymaktivitäten von Komplexen der Atmungskette im M. soleus von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Die Enzymaktivitäten für die Feuchtgewichte (ww) sind in U/g ww angegeben. Die Angaben für die Normierungen auf CS und NCP erfolgen als relative Einheiten. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01); (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 12)

Die sich anschließende Berechnung der unter 4.2.1 beschriebenen Quotienten für die Komplexe der Atmungskette ergab folgende Ergebnisse.

Im M. soleus fand sich eine Erniedrigung der SRNO um 23,43 %. Weiterhin konnte eine Erniedrigung der KIII-RNO von 20,71 % festgestellt werden. Die zusätzliche Möglichkeit des Abgleichens der Werte auf KI + III führte zu einem entsprechenden Anstieg von 31,37 % bei KII + III/KI + III, was wiederum auf eine relativ höhere Enzymaktivität des Komplexes II schließen lässt. Die Änderungen waren statistisch nicht signifikant (Abbildung 4-7).





	KI + III/KII + III	KI + III/KIII	KII + III/KI + III
jung	0,92 ± 0,13	0,09 ± 0,008	1,24 ± 0,22
alt	0,70 ± 0,10	0,07 ± 0,005	1,63 ± 0,16

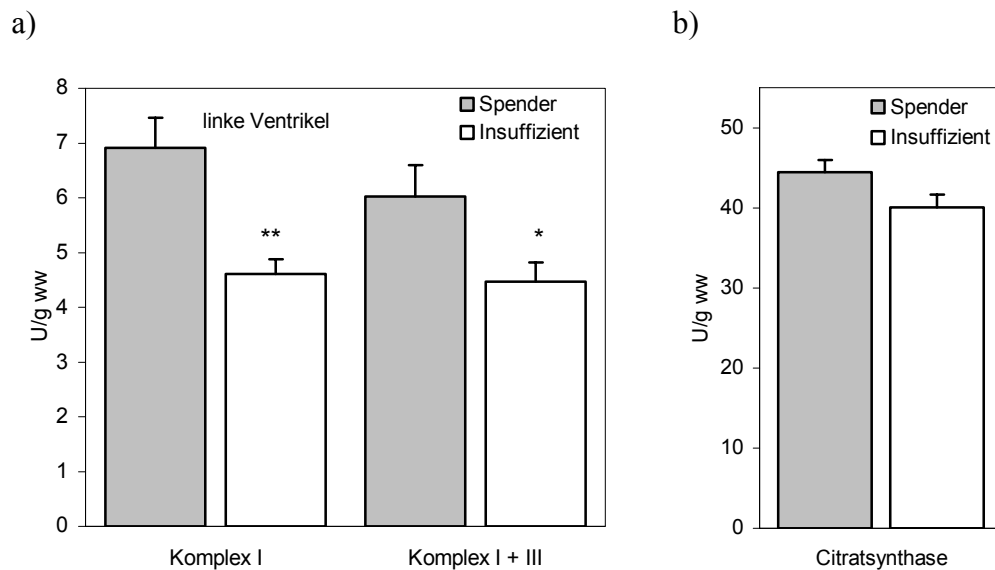
**Abbildung 4-7: Graphische und tabellarische Darstellung der Quotienten der Enzymaktivitäten im M. soleus junger und alter Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Die Werte sind als relative Einheiten ± SEM angegeben. (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 12)

Im Skelettmuskel alter Ratten fand sich die generelle Erniedrigung der Aktivitäten von Komplex I sowie Komplex I + III wieder. Weiterhin konnte über eine hochsignifikant erniedrigte Citratsynthaseaktivität auf eine Verringerung der Mitochondrienzahl geschlossen werden. Die Werte der unabhängigen Quotienten SRNO sowie KIII-RNO weisen jedoch auch hier auf eine von der Anzahl der Mitochondrien unabhängige Komplex I-Erniedrigung hin. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen aus 4.2.1 im Myokard alter Ratten.

#### 4.2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten in humanen linken Ventrikeln

Für die Untersuchungen der Enzymaktivitäten der Komplexe der Atmungskette in humanen linken Ventrikeln wurden Proben von Patienten mit DCM (n = 23) und ICM (n = 20) sowie von Spendern (n = 10) verwendet. Die Unterschiede in den Enzymaktivitäten zwischen den Proben der Patienten mit DCM und ICM (siehe Tabelle 7-3 im Anhang) waren vernachlässigbar klein, so dass im Folgenden nur noch das Kollektiv der 43 insuffizienten Herzen im Vergleich zu den 10 Spenderherzen gezeigt wird.

Die Auswertung der Daten wies in allen Fällen auf eine Erniedrigung der Enzymaktivitäten (U/g ww) in den insuffizienten Geweben im Vergleich zum Spendermyokard hin.



	Komplex I	Komplex I + III	Citratsynthase
Spender	6,91 ± 0,55	6,03 ± 0,57	44,45 ± 1,51
Insuffizient	** 4,61 ± 0,26	* 4,47 ± 0,35	40,08 ± 1,53

**Abbildung 4-8: Darstellung der Ergebnisse der Messung der Enzymaktivitäten in linken Ventrikeln gesunder und insuffizienter Herzen:** a) zeigt die Messergebnisse von Komplex I und Komplex I + III; b) zeigt die Ergebnisse der Citratsynthase; Die Werte sind als U/g ww ± SEM angegeben. (Insuffizient n = 43, Spender n = 10)

Folgende Änderungen der Enzymaktivitäten konnten bei den Untersuchungen festgestellt werden: hochsignifikante Erniedrigung von Komplex I um 33,2 % ( $p < 0,001$ ), signifikante Erniedrigung von Komplex I + III um 25,9 % ( $p = 0,047$ ) sowie eine Erniedrigung der Citratsynthase um 9,8 % (n.s.) (Abbildung 4-8).

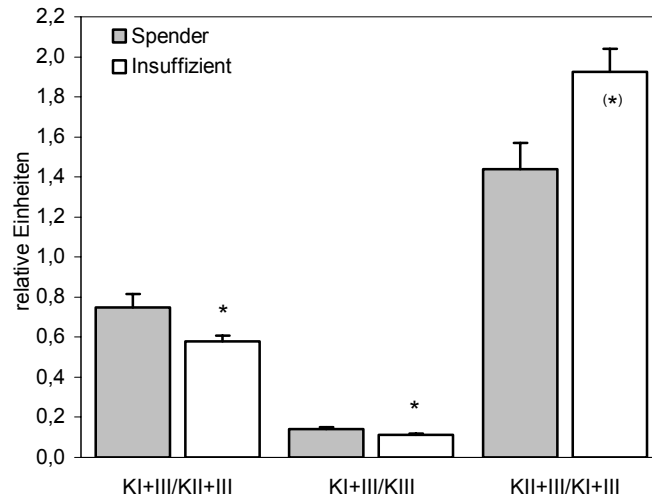
Die Aktivität von Komplex I war auch nach dem Abgleich auf die Citratsynthase hochsignifikant um -26,5 % ( $p < 0,001$ ) erniedrigt. Der Wert für NCP war mit 0,6 % praktisch unverändert. Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

	Spender	Insuffizient	Änderung [%]
Komplex I ww	6,91 ± 0,55	4,61 ± 0,26	** -33,24
Komplex I / CS	15,61 ± 1,27	11,47 ± 0,43	** -26,49
Komplex I / NCP	121,48 ± 18,89	91,75 ± 10,91	-24,48
Komplex I + III ww	6,03 ± 0,57	4,47 ± 0,35	*-25,87
Komplex I + III / CS	13,70 ± 1,44	10,92 ± 0,66	-20,29
Komplex I + III / NCP	112,46 ± 23,94	93,20 ± 13,15	-17,13
Komplex II + III ww	8,17 ± 0,47	7,81 ± 0,49	-4,44
Komplex II + III / CS	18,37 ± 0,79	19,21 ± 0,96	4,57
Komplex II + III / NCP	149,02 ± 27,29	166,49 ± 23,18	11,72
Komplex III ww	43,48 ± 2,34	38,44 ± 2,02	-11,59
Komplex III / CS	98,22 ± 5,17	97,22 ± 4,11	-1,02
Komplex III / NCP	779,28 ± 125,41	787,79 ± 96,32	1,09
COX ww	20,62 ± 1,62	16,46 ± 1,18	-20,17
COX / CS	46,44 ± 3,49	40,55 ± 2,31	-12,67
COX / NCP	373,58 ± 69,75	329,99 ± 45,34	-11,67
Citratsynthase ww	44,45 ± 1,51	40,08 ± 1,53	-9,82
Citratsynthase / NCP	811,73 ± 141,21	809,95 ± 92,17	-0,22
NCP	64,87 ± 7,56	65,25 ± 4,01	0,6

**Tabelle 4-4: Zusammenstellung der Ergebnisse der Bestimmung der Enzymaktivitäten von Komplexen der Atmungskette in humanen linken Ventrikeln:** Die Enzymaktivitäten für die Feuchtgewichte (ww) sind in U/g ww angegeben. Die Angaben für die Normierungen auf CS und NCP erfolgen als relative Einheiten. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) (Insuffizient  $n = 43$ , Spender  $n = 10$ )

Auch bei den humanen Proben wurden die unter 4.2.1 beschriebenen Quotienten für die Komplexe der Atmungskette gebildet, um eine von anderen Parametern (ww, CS, NCP) unabhängige Größe zu erhalten und somit einen direkten Vergleich der Enzymaktivitäten der Komplexe untereinander zu ermöglichen. Dabei ergaben sich die folgenden Ergebnisse.

Die SRNO war in den insuffizienten humanen Myokardproben um 22,4 % ( $p = 0,015$ ) ebenso wie die KIII-RNO um 19,5 % ( $p = 0,029$ ) signifikant erniedrigt. Folglich konnte ein knapp signifikanter Anstieg der KII + III/KI + III um 33,9 % ( $p = 0,051$ ) festgestellt werden (Abbildung 4-8).



	KI + III/KII + III	KI + III/III	KII + III/KI + III
Spender	0,75 ± 0,07	0,14 ± 0,01	1,44 ± 0,13
Insuffizient	* 0,58 ± 0,03	* 0,11 ± 0,01	(*) 1,93 ± 0,11

**Abbildung 4-9: Graphische und tabellarische Darstellung der Quotienten der Enzymaktivitäten in linken humanen Ventrikeln:** Die Werte sind als relative Einheiten ± SEM angegeben. (Insuffizient n = 43, Spender n = 10)

Bei den Messungen der Enzymaktivitäten von Atmungskettenkomplexen in humanen linken Ventrikeln konnte eine generelle Erniedrigung der Aktivitäten von Komplex I sowie Komplex I + III in den insuffizienten Proben gezeigt werden. Die Quotienten SRNO sowie KIII-RNO belegen, dass dieses Komplex I-Defizit nicht auf einer Verringerung der Mitochondrienzahl beruht, zumal die Aktivität der Citratsynthase in diesem Fall nur geringfügig vermindert war.

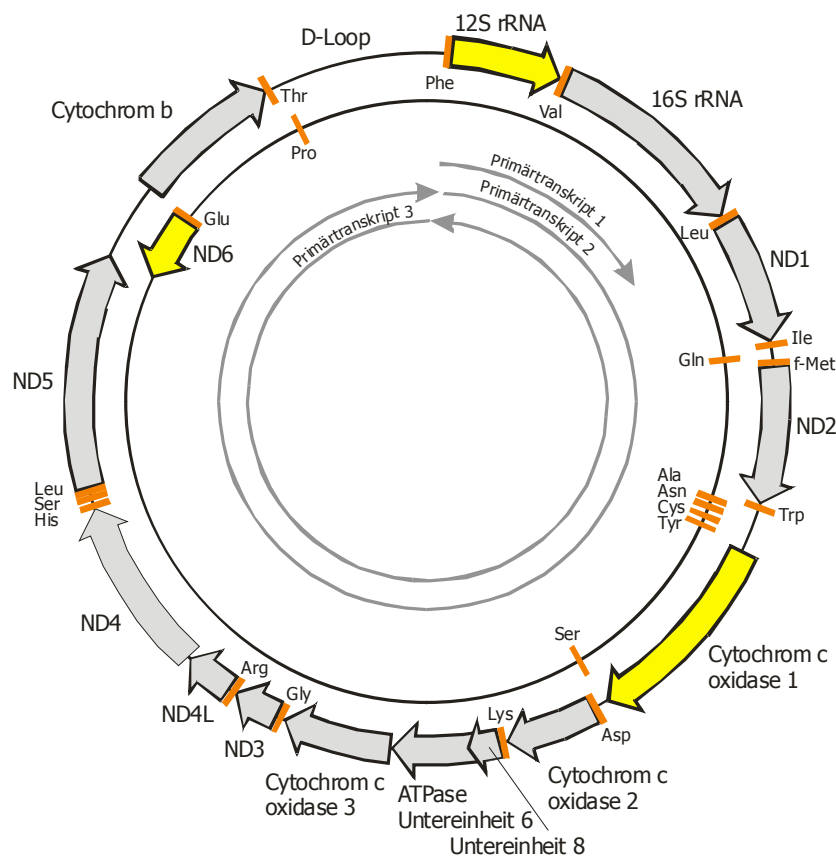
Somit konnte in den Proben des humanen Myokards die Komplex I-Erniedrigung ebenso gezeigt werden, wie im Myokard und im Skelettmuskel alter Ratten (4.2.1, 4.2.2). In beiden untersuchten Modellen war die Aktivitätsänderung nicht ausschließlich durch eine Verminderung der Mitochondrienzahl bedingt.

### 4.3 Quantifizierung mitochondrialer und nukleärer Transkripte

Die menschliche mitochondriale DNA ist das kleinste bekannte mtDNA-Molekül. Es ist ein geschlossenes, zirkuläres, doppelsträngiges Molekül mit 16.569 bp. Die Anzahl der Mito-

chondrien pro Zelle variiert stark in Abhängigkeit vom Gewebetyp, jedoch bleibt die Anzahl der mtDNA-Moleküle (zwischen 2 und 10) pro Mitochondrium konstant (Robin *et al.*, 1988). Daraus resultiert eine große und in Abhängigkeit vom Gewebetyp zwischen 1.000 und 10.000 variierende Anzahl mtDNA-Kopien pro Zelle (Bogehagen *et al.*, 1974). Die Menge der genetischen Information der mitochondrialen DNA ist sehr gering. Weniger als 5 % der mitochondrialen Proteine werden durch sie codiert, die Mehrzahl ist nukleär codiert. Die mitochondriale DNA ist nicht mit Histonen komplexiert und nicht in Nukleosomen organisiert. Aktuelle Arbeiten deuten jedoch darauf hin, dass der mitochondriale Transkriptionsfaktor (mtTFA) eine histonartige strukturelle Rolle für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen DNA spielt (Kanki *et al.*, 2004), indem die mitochondriale DNA eine Nukleoid-Struktur bildet. Dabei ist der mtTFA als eine Hauptkomponente dieses Nukleoids mit der mitochondrialen DNA fest verbunden (Kanki *et al.*, 2004). Eine weitere Besonderheit des mitochondrialen Genoms ist sein maternaler Vererbungsmodus (Wallace, 1999). Bei der Verschmelzung von Oozyte und Spermium stammen alle Mitochondrien von der mütterlichen Seite, da der Mitochondrien enthaltende Schwanzteil der Samenzellen nicht in die Eizelle eindringt. Die mitochondriale DNA des Menschen (Abbildung 4-10) besitzt Gene für zwei rRNAs, 22 tRNAs und 13 Proteine, wovon 12 als Proteine der inneren Mitochondrienmembran identifiziert sind. Es erfolgt keine Einschleusung von tRNAs aus dem Zytoplasma; die 22 tRNAs sind ausreichend, um alle Codons zu lesen. Der genetische Code der Mitochondrien differiert vom Standardcode und auch zwischen verschiedenen Organismen, was mit einem Verlust der Universalität einhergeht. So wird im mitochondrialen Genom der genetische Code modifiziert (UGA → Trp, AGA und AGG → Stopp, AUA → Met, AUA und AUU → Start). Der H-Strang (Heavy) enthält die meisten Gene, auf dem L-Strang (Light) liegen einige tRNAs und ND6. Zwischen codierenden Abschnitten finden sich in der humanen mitochondrialen DNA keine nichtcodierenden Sequenzen. In stoffwechselaktiven Vertebratenzellen trägt eine Reihe der Ringe eine kurze dreisträngige Struktur, den D-Loop (*displacement loop*) (Abbildung 4-10). Dieser ist 1.118 bp lang und liegt zwischen tRNA<sup>Phe</sup> und tRNA<sup>Pro</sup>, wobei ein kurzer Nukleinsäurestrang (komplementär zum L-Strang) den H-Strang ersetzt. Dieser D-Loop ist der Startbereich für die Synthese des H-Stranges bei der Replikation (enthält *leading-strand-origin*) und Ort des Promotors für die Transkription. Transkription und Translation hängen von wichtigen kerncodierten Faktoren ab, so werden alle mitochondrialen ribosomalen Proteine importiert. Das Primärtranskript I startet *upstream* der tRNA<sup>Phe</sup> und endet nach der 16S rRNA, Primärtranskript II startet *downstream* in der Nähe des 5'Endes der 12S rRNA und erstreckt sich einmal komplett um die kreisförmige mitochondriale DNA. Ein Primärtranskript wird

dann durch prozessierende Enzyme (Maturasen) in die verschiedenen RNAs gespalten. Diese Spaltung muss sehr präzise erfolgen, da das 5'-Ende jeder mRNA an das 3'-Ende der tRNA angrenzt. Primärtranskript I wird ca. zehnmal häufiger transkribiert als Transkript II, wodurch rRNAs und zwei tRNAs im Überfluss produziert werden. Durch das Fehlen von Introns und nichtcodierenden Bereichen hat die mitochondriale DNA eine höhere Informationsdichte als nukleäre DNA; Mutationen müssten demnach häufig zu beobachten sein. Proteine, die auf der mitochondrialen DNA codiert sind, werden auch an mitochondrialen Ribosomen translatiert. Es erfolgt kein Export von RNA oder Proteinen (Clayton, 1991; Clayton, 1992).



**Abbildung 4-10: Organisation der humanen mtDNA** (verändert nach Darnell *et al.*, 1990): Die Transkription des H-Stranges erfolgt im Uhrzeigersinn, die des L-Stranges entgegen dem Uhrzeigersinn. Die mtDNA der Säuger enthält keine Introns. ND# = Untereinheit des NADH-CoQ-Reduktase Komplexes. Die Abkürzungen der Aminosäuren stehen für die entsprechenden tRNA-Gene (rot dargestellt). Nukleotid 1 liegt 577 bp vor tRNA<sup>Phe</sup>. Gelb markierte Gene wurden durch kompetitive standardkalibrierte RT-PCR untersucht.

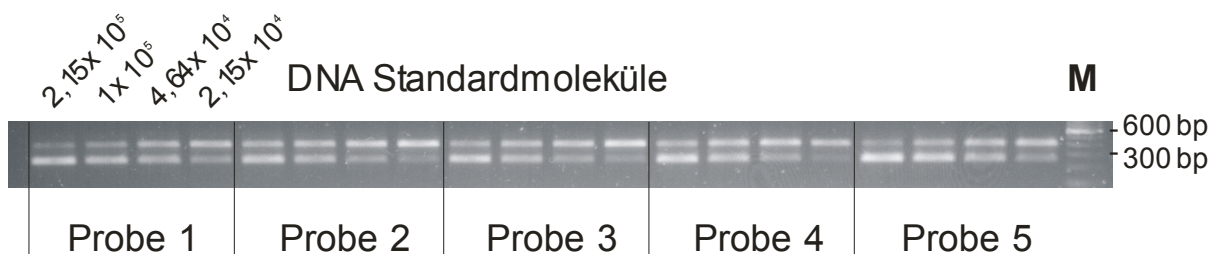
Für die Quantifizierung der mitochondrialen mRNA-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit von jedem der drei mitochondrialen Primärtranskripte ein Gen durch kompetitive

standardkalibrierte RT-PCR untersucht. Von Primärtranskript 1 wurde die 12S rRNA, von Primärtranskript 2 die COX1 und von Primärtranskript 3 die Untereinheit ND6 exemplarisch ausgewählt (Abbildung 4-10), um Unterschiede in der Transkription der Primärtranskripte festzustellen (s.o.). Weiterhin wurde als kerncodiertes mitochondriales Protein die  $\alpha$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase (im Folgenden als ATPase bezeichnet) in die Untersuchungen als Vergleich einbezogen. Diese Untersuchungen erfolgten im Myokard junger und alter Ratten sowie in Proben gesunder und insuffizienter humaner Ventrikel.

Die Abbildung 4-11 gibt ein repräsentatives Gelbild einer kompetitiven standardkalibrierten RT-PCR der ATPase aus linksventrikulären Gewebeproben (LV) wieder. Die PCR-Amplifizierung erfolgte mit den entsprechenden genspezifischen Primern wie in Tabelle 3-4 angegeben. Die unter 3.5.1 und 3.5.2 hergestellten Standards wurden pro Ansatz für die einzelnen Gene auf entsprechende Molekülzahlen verdünnt (vgl. Tabelle 4-5).

	A	B	C	D
12S rRNA	$1,00 \cdot 10^9$	$4,64 \cdot 10^8$	$2,15 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^8$
COX1	$4,64 \cdot 10^7$	$2,15 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^7$	$4,64 \cdot 10^6$
ND6	$4,64 \cdot 10^6$	$2,15 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^6$	$4,64 \cdot 10^5$
ATPase	$2,15 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	$4,64 \cdot 10^4$	$2,15 \cdot 10^4$

**Tabelle 4-5: Bei der kompetitiven standardkalibrierten RT-PCR kamen jeweils 4 Verdünnungsstufen der Standards je Probe zum Einsatz:** Die Verdünnungsstufen wurden logarithmisch festgelegt, um bei der Auswertung eine gleichmäßige Verteilung der Punkteschar zu erreichen (Angaben in Molekülzahlen/ $\mu$ l). A, B, C und D stehen für die vier verwendeten RT-Ansätze jeder zu bestimmenden Probe (vgl. 3.5.2 bzw. 3.5.3)



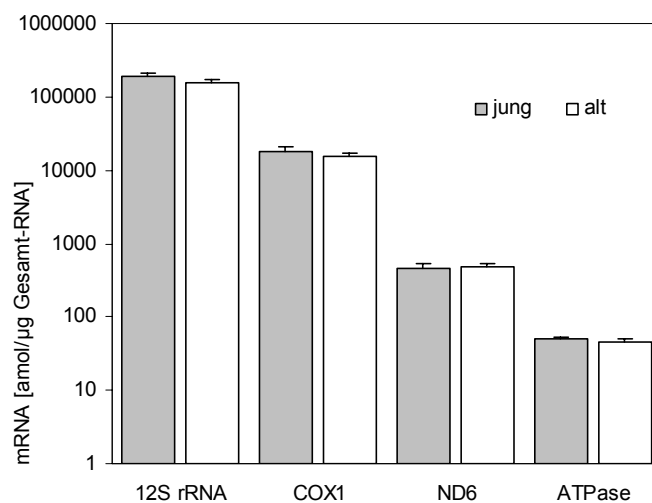
**Abbildung 4-11: Repräsentatives Gelbild der kompetitiven standardkalibrierten RT-PCR über mehrere Proben des LV der  $\alpha$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase:** Die obere Bande ist das Target (418 bp) und die untere der verkürzte Standard (265 bp). M = 100 bp-Leiter. Von jeder zu untersuchenden Probe wurden vier RT-Ansätze A, B, C und D (vgl. Tabelle 4-5) pipettiert.

Die Expression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors mtTFA wurde mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht (Tabelle 3-6).

#### 4.3.1 Vergleich der mitochondrialen Transkripte im Myokard von jungen und alten Sprague-Dawley-Ratten

Untersucht wurde die mRNA-Expression im linken Ventrikel acht Wochen alter ( $n = 5$ ) sowie zwei Jahre alter ( $n = 8$ ) Sprague-Dawley-Ratten. Es wurden je 300 ng Gesamt-RNA pro RT-Ansatz zur Herstellung der Templates eingesetzt.

Das häufigste mitochondriale Transkript war die 12S rRNA, welche aus dem Primärtranskript 1 stammt. Dieses war ca. um den Faktor 10 höher exprimiert als das Primärtranskript 2, von welchem die COX1 untersucht wurde. Das Primärtranskript 3, auf dem sich ND6 befindet, war nochmals ca. um den Faktor 35 geringer exprimiert als Primärtranskript 2. Die mRNA der kerncodierten ATPase war am niedrigsten exprimiert.



	12S rRNA	COX1	ND6	ATPase
jung	$1,87 \cdot 10^5 \pm 1,97 \cdot 10^4$	$1,75 \cdot 10^4 \pm 3,58 \cdot 10^3$	$454,40 \pm 84,75$	$49,59 \pm 3,75$
alt	$1,57 \cdot 10^5 \pm 1,30 \cdot 10^4$	$1,53 \cdot 10^4 \pm 2,12 \cdot 10^3$	$490,89 \pm 52,07$	$44,82 \pm 4,85$

**Abbildung 4-12: Quantifizierung mitochondrialer und nukleärer Transkripte aus linken Ventrikeln junger und alter Sprague-Dawley-Ratten:** Alle Werte sind als amol/μg Gesamt-RNA ± SEM angegeben. (junge Tiere  $n = 5$ , alte Tiere  $n = 8$ )



Die Quantifizierung ergab nur geringe Veränderungen in der Expression der Transkripte in den linken Ventrikeln der alten Tiere gegenüber den jungen Tieren: 12S rRNA (-15,99 %), COX1 (-12,63 %), ATPase (-9,62 %), ND6 (8,03 %). Diese Änderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 4-12).

Im Ergebnis der Untersuchungen der mitochondrialen Transkripte aus dem Myokard junger und alter Sprague-Dawley-Ratten zeigten sich lediglich die unter 4.3 beschriebenen Unterschiede in der Expressionshöhe der einzelnen Primärtranskripte. Es waren jedoch weder für die untersuchten mitochondrialen Gene noch für das kerncodierte Gen signifikante Änderungen der Expression im Vergleich zwischen den jungen und den alten Tieren nachweisbar.

#### **4.3.2 Vergleich der myokardialen mitochondrialen Transkripte in jungen und alten Fisher-Ratten nach L-NAME-Behandlung**

Der Apoptose von Kardiomyozyten wird eine kausale Rolle für die Progredienz der Herzinsuffizienz bei kardialer Überlast zugesprochen (Teiger *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995). Nur relativ wenige Myozyten (etwa 0,2 %) weisen Zeichen der Kernapoptose auf, aber mehr als die Hälfte der Kardiomyozyten haben bei Herzinsuffizienz bereits eine massive Freisetzung von Cytochrom c aus ihren Mitochondrien und eine Aktivierung der Caspasen im Cytosol (Saraste *et al.*, 1999; Olivetti *et al.*, 1997). Diese frühen, reversiblen Apoptoseschritte (cytosolische Apoptose) beeinträchtigen noch vor nachweisbaren Kernveränderungen die Myokardfunktion bei Herzinsuffizienz, sind aber bei antiapoptotischen Interventionen noch umkehrbar im Sinne einer echten Myokarderholung, solange der Kern noch funktionell intakt und damit zur Steuerung von Neusynthese fähig ist (Kerr *et al.*, 1999). In Zusammenarbeit mit dem Institut für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurden in einem Modell mit überlastinduzierter Myokardapoptose funktionelle Folgen früher Apoptosestadien am Myokard *in situ* charakterisiert. Aufgrund der dortigen Vorarbeiten wurde dafür das Rattenmodell mit Bluthochdruck durch chronische NO-Synthase-Hemmung verwendet. Zur Untersuchung wurden junge (sechs Monate) und senile (19 – 24 Monate) Ratten mit L-NAME behandelt. Die Gabe von L-NAME erfolgte über das Trinkwasser (0,75 mg/ml täglich frisch hergestellt). Die Überprüfung der arteriellen Hypertonie erfolgte durch Fr. Dr. Müller am Institut für Umwelttoxikologie per intraarterieller kontinuierlicher Blutdrucktelemetrie, die Analyse der Herzfunktion *in vivo* per transthorakaler Echokardiographie.

	junge Tiere	alte Tiere
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	106,6 ± 0,4	104,6 ± 0,5
2 d L-NAME	157,0 ± 5,9	134,0 ± 5,8
4 d L-NAME	168,0 ± 7,2	145,0 ± 5,5
13 d L-NAME	161,8 ± 9,8	109,7 ± 1,6

**Tabelle 4-6: Ergebnisse der Blutdruckmessungen an jungen und alten Fisher-Ratten nach Gabe von L-NAME:** Die Gabe von L-NAME führte bei den jungen Tieren (sechs Monate) zu einer starken Erhöhung des Blutdrucks, wogegen es bei alten Tieren (19 bzw. 24 Monate) nur zu einem geringen Anstieg kommt. Dieser führt im weiteren Verlauf zu starker Dilatation des rechten Ventrikels, womit ein Absinken des Blutdrucks einhergeht. Angegeben sind die systolischen Werte in mmHg ± SEM.

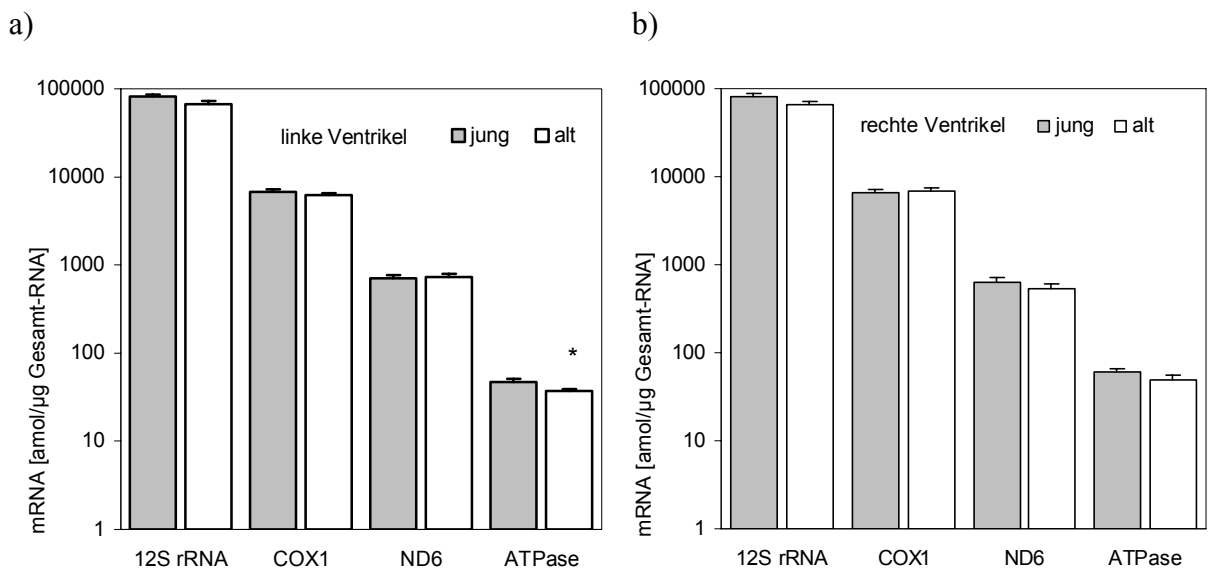
Die chronische Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME bewirkte in jungen Ratten einen anhaltenden Bluthochdruck ohne Gewichtszunahme des linken Ventrikels (Müller *et al.*, 2000) (Tabelle 4-6). In senilen Ratten bewirkte L-NAME nur eine mäßige, transiente Hypertonie, die aber mit Rechtsherzdekompensation und Reduktion des Herzminutenvolumens, mit Pulmonalhypertonie, Dilatation und Myokardapoptose der freien Wand des rechten Ventrikels einhergeht (Jager *et al.*, 2002) (Tabelle 4-6). Diese funktionellen Störungen könnten möglicherweise ihre Ursachen in einer Veränderung der Genexpression haben.

Für die Untersuchungen zur mitochondrialen und nukleären Genexpression kamen Proben aus den linken und rechten Ventrikeln einer Gruppe von Tieren zum Einsatz (nachfolgend als Fisher-L-NAME-Ratten bezeichnet), die sich wie folgt zusammensetzte:

6 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	n = 3
	2 d L-NAME	n = 5
	4 d L-NAME	n = 5
19 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	n = 5
	2 d L-NAME	n = 5
	4 d L-NAME	n = 5
24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	n = 2

Das Gewicht der jungen Tiere betrug  $342 \pm 6$  g, das der alten Tiere  $370 \pm 10$  g ( $p = 0,034$ ). Auch hier wurden je 300 ng Gesamt-RNA für den RT-Ansatz zur Herstellung der Templates verwendet. Im Zuge der Auswertung der Daten aus den einzelnen Gruppen (Alter vs. Gabe

von L-NAME) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren einer Altersgruppe bezüglich der Gabe von L-NAME festgestellt werden (vgl. Tabelle 7-5 im Anhang). Aus diesem Grund sind in den folgenden Abbildungen und Tabellen die Gruppen wie folgt zusammengefasst: sechs Monate junge Tiere (n = 13) und 19/24 Monate alte Tiere (n = 17). Sowohl in den linken als auch in den rechten Ventrikeln der mit L-NAME behandelten Fisher-Ratten war das Primärtranskript 1 mit der 12S rRNA am häufigsten exprimiert, gefolgt von Primärtranskript 2 mit der COX1 und Primärtranskript 3 mit ND6. Die mRNA der kerncodierten ATPase war auch hier am geringsten exprimiert (Abbildung 4-13).



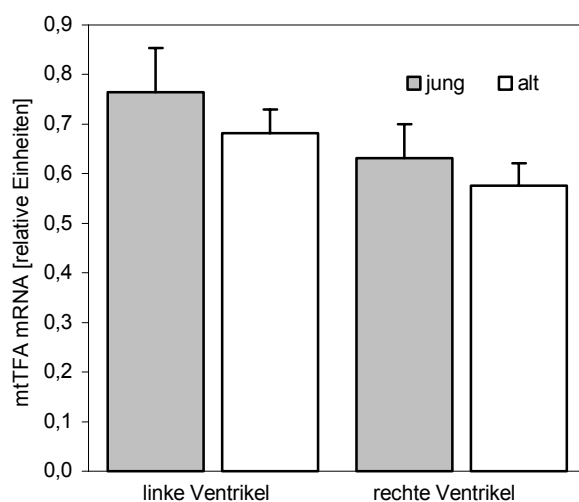
	12S rRNA	COX1	ND6	ATPase
<b>a) linke Ventrikel</b>				
jung	$8,19 \cdot 10^4 \pm 4,02 \cdot 10^3$	$6,71 \cdot 10^3 \pm 4,81 \cdot 10^2$	$709,18 \pm 61,11$	$42,27 \pm 3,78$
alt	$6,74 \cdot 10^4 \pm 5,52 \cdot 10^3$	$6,22 \cdot 10^3 \pm 3,60 \cdot 10^2$	$730,94 \pm 62,95$	* $37,23 \pm 1,96$
<b>b) rechte Ventrikel</b>				
jung	$8,04 \cdot 10^4 \pm 7,31 \cdot 10^3$	$6,63 \cdot 10^3 \pm 6,39 \cdot 10^2$	$628,87 \pm 100,83$	$60,03 \pm 6,17$
alt	$6,59 \cdot 10^4 \pm 4,43 \cdot 10^3$	$6,94 \cdot 10^3 \pm 4,38 \cdot 10^2$	$529,37 \pm 64,85$	$49,53 \pm 5,38$

**Abbildung 4-13: Ergebnisse der Quantifizierung der mRNA aus linken und rechten Ventrikeln junger und alter Fisher-L-NAME-Ratten:** a) Darstellung der Ergebnisse aus den linken Ventrikeln; b) Ergebnisse der Untersuchungen aus den rechten Ventrikeln; alle Werte sind als amol/µg GesamtrNA ± SEM angegeben. (junge Tiere n = 13, alte Tiere n = 17)

Die Expressionsuntersuchungen ergaben somit für die Proben des linken Ventrikels folgende Änderungen der Transkription in alten gegenüber jungen Tieren: 12S rRNA (-17,7 %), COX1 (-7,25 %), ND6 (3,07 %) und ATPase (-21,25 %). In den rechten Ventrikeln fanden sich nachfolgende Änderungen: 12S rRNA (-18,04 %), COX1 (4,68 %), ND6 (-15,82 %) und ATPase (-17,49 %).

Es konnten bei keinem der untersuchten mitochondrialen Gene signifikante Änderungen der Expression festgestellt werden, dagegen war die mRNA der kerncodierten ATPase im LV signifikant erniedrigt ( $p = 0,018$ ) (Abbildung 4-13a).

Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (mtTFA, Tfam) spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der mitochondrialen Transkription in Säugetieren sowie bei der Replikation der mitochondrialen DNA, da bei der Transkription RNA-Primer generiert werden, die für die Initiierung der mtDNA-Replikation (H-Strang-Synthese) notwendig sind (Larsson *et al.*, 1997). Der mtTFA ist ein kerncodiertes 25 kDa großes Protein und spielt eine essentielle Rolle bei der strukturellen Aufrechterhaltung der menschlichen mitochondrialen DNA (Kanki *et al.*, 2004). Er bindet asymmetrisch an die Stelle des Transkriptionsstarts und stellt damit sicher, dass die Transkription nur in eine Richtung verläuft. Der mtTFA windet die mitochondriale DNA auf, und die Konformationsänderung erlaubt es der RNA-Polymerase anzusetzen (Clayton, 1991; Clayton, 1992).



	linke Ventrikel	rechte Ventrikel
jung	0,764 ± 0,089	0,632 ± 0,068
alt	0,681 ± 0,048	0,576 ± 0,044

**Abbildung 4-14: Graphische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zur Expression des mtTFA aus linken und rechten Ventrikeln junger und alter Fisher-L-NAME-Ratten:** Der Abgleich erfolgte auf 18S rRNA. Alle Werte sind in relativen Einheiten ± SEM angegeben. (junge Tiere n = 13, alte Tiere n = 17)

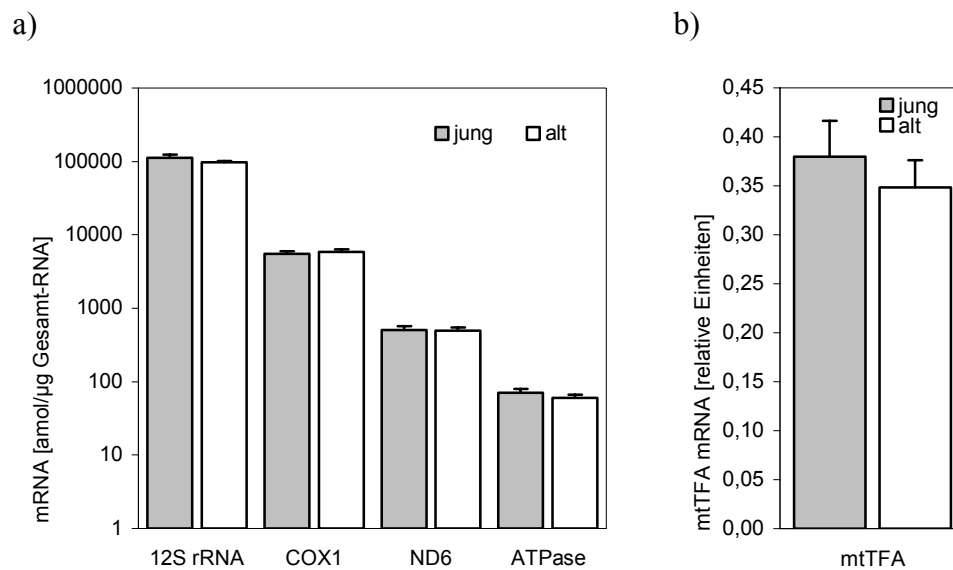
Die semiquantitative RT-PCR des mtTFA erfolgte wie unter 3.6 beschrieben. Ein exemplarisches Gelbild zeigt Abbildung 3-9. In den untersuchten Fisher-L-NAME-Ratten konnten im Alter geringe Erniedrigungen der mRNA-Expressionshöhe des mtTFA sowohl im linken Ventrikel (-10,89 %) als auch im rechten Ventrikel (-8,78 %) nachgewiesen werden. Diese waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 4-14).

Wie bei den Sprague-Dawley-Ratten unter 4.3.1, ließen sich auch bei den Fisher-L-NAME-Ratten die typischen Unterschiede in der Expression von Primärtranskript 1 bis Primärtranskript 3 aufzeigen. Dabei fanden sich hier ebenfalls keine signifikanten Änderungen der mitochondrialen Genexpression im Myokard von jungen und alten Ratten. Bei der Untersuchung der Expression der nukleär codierten Gene waren bis auf Ausnahme der ATPase im LV keine signifikanten Änderungen feststellbar.

#### **4.3.3 Expressionsuntersuchungen der Transkripte an Fisher-Ratten nach Coenzym Q<sub>10</sub>-Behandlung**

Analog den Untersuchungen der mitochondrialen Transkription von Sprague-Dawley-Ratten (4.3.1) und Fisher-L-NAME-Ratten (4.3.2) wurden bei den Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten für die kompetitive standardkalibrierte RT-PCR 300 ng Gesamt-RNA für den RT-Ansatz verwendet bzw. die semiquantitative RT-PCR auf die 18S rRNA abgeglichen. Die Reaktionen erfolgten nach den bereits beschriebenen Protokollen. Hier konnten bei der Auswertung der Ergebnisse der Einzelgruppen ebenfalls keine Effekte der Gabe von CoQ<sub>10</sub> auf die Expression der untersuchten mRNA festgestellt werden (vgl. Tabelle 7-6 im Anhang), so dass im Folgenden der Vergleich der jungen Tiere (n = 6) mit den alten Tieren (n = 16) dargestellt wird.

Bei den mit CoQ<sub>10</sub> behandelten Ratten zeigte sich nach den Untersuchungen die gleiche prinzipielle Verteilung der Transkripte. So war auch hier Primärtranskript 1 am stärksten vertreten, gefolgt von Primärtranskript 2 und Primärtranskript 3. Die kerncodierte ATPase war in diesen Proben ebenfalls am geringsten exprimiert (Abbildung 4-15).



	12S rRNA	COX1	ND6	ATPase	mtTFA
jung	$1,12 \cdot 10^5 \pm 1,29 \cdot 10^4$	$5,51 \cdot 10^3 \pm 4,89 \cdot 10^2$	$501,12 \pm 74,47$	$71,31 \pm 8,74$	$0,380 \pm 0,037$
alt	$9,69 \cdot 10^4 \pm 5,05 \cdot 10^3$	$5,88 \cdot 10^3 \pm 4,69 \cdot 10^2$	$496,95 \pm 54,28$	$59,86 \pm 6,12$	$0,348 \pm 0,028$

**Abbildung 4-15: Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung aus linken Ventrikeln junger und alter Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** a) Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR der mitochondrialen Transkripte sowie der ATPase; b) Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR des mtTFA. Der Abgleich erfolgte auf 18S rRNA. Die Werte der kompetitiven RT-PCR sind als amol/µg Gesamt RNA ± SEM angegeben, die Werte der semiquantitativen RT-PCR in relativen Einheiten ± SEM. (junge Tiere n = 6, alte Tiere n = 16)

Die Expressionsuntersuchungen für die Proben des linken Ventrikels der Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten ergaben eine geringfügige Erniedrigung der mRNA-Expression der mitochondrialen Gene in den alten Tieren mit Ausnahme von COX1, die wie folgt ausfielen: 12S rRNA (-13,51 %), COX1 (6,65 %), ND6 (-0,83 %), ATPase (-16,06 %). Die Expression des mtTFA war in den alten Tieren dieser Gruppe ebenso geringfügig aber nicht signifikant erniedrigt (-8,24 %) (Abbildung 4-15).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei der Untersuchung der Genexpression von jungen und alten Ratten keine signifikanten Änderungen aufgezeigt werden konnten. Dies betraf sowohl die drei untersuchten Gene der mitochondrialen DNA (12S rRNA, COX1, ND6), als auch die kerncodierten Gene (ATPase, mtTFA). Die Ergebnisse waren in allen drei verwendeten Rattenstämmen zu finden, die bei den Experimenten zum Einsatz kamen.

Weiterhin waren auch keine Auswirkungen der Gabe von L-NAME (4.3.2) bzw. Coenzym Q<sub>10</sub> (4.3.3) auf die Expression der untersuchten Gene feststellbar.

#### **4.3.4 Vergleich der mitochondrialen und nukleären Transkripte in humanen Myokardproben**

Für die Untersuchungen der Genexpression der humanen Myokardproben wurde Material von 19 Patienten mit ICM, 23 Patienten mit DCM sowie von zehn Proben mit Spendermaterial eingesetzt.

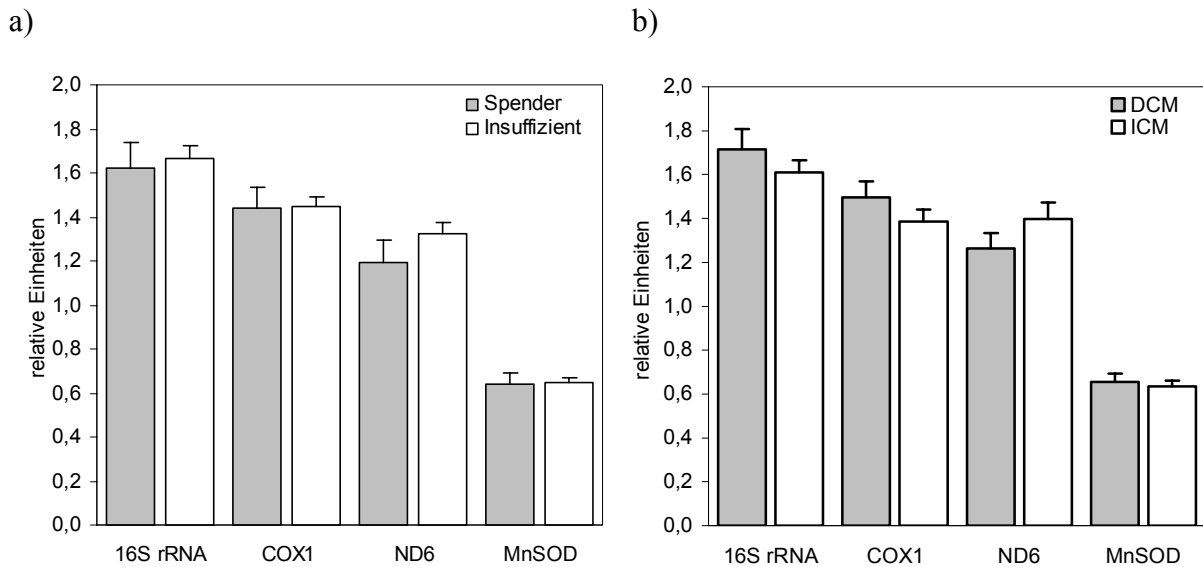
Von diesen Proben wurden folgende mitochondriale Gene mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht: 16S rRNA, COX1, ND6. Die Wahl des zu untersuchenden Gens von Primärtranskript 1 fiel diesmal auf die 16S rRNA und nicht wie bei den Proben der Ratten auf die 12S rRNA, da diese Sequenz später auch zum Herstellen der Sonden bei der Untersuchung der mitochondrialen DNA mittels Southern Blot genutzt wurde (vgl. 3.7 und 4.4).

Weiterhin wurde bei der Untersuchung der humanen Myokardproben die MnSOD und nicht die ATPase als nukleäres Vergleichsgen herangezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den von Ide (Ide *et al.*, 2001) gezeigten Daten zu erzielen.

Der mitochondriale Transkriptionsfaktor mtTFA wurde nicht mit Hilfe der PCR untersucht, sondern ebenfalls in Anlehnung an Ide (Ide *et al.*, 2001) über Proteinbestimmung mittels Westernblot. Die Untersuchungen erbrachten keine signifikanten Expressionsunterschiede: Insuffizient:  $1,32 \pm 0,25$ ; Spender:  $1,03 \pm 0,11$ ;  $p = 0,43$ ; +27,9 % (alle Werte in relativen Einheiten) (Scheubel *et al.*, 2002).

Im Zuge der Auswertung der Daten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene beobachtet werden (vgl. Tabelle 7-7 im Anhang). Dies betraf zum einen den direkten Vergleich des Spendermyokards gegenüber dem kranken Myokard, als auch den Vergleich der DCM- und ICM-Proben untereinander.

Die Untersuchungen der Genexpression in humanen Myokardproben ergaben folgende Änderungen im Vergleich zwischen insuffizientem und gesundem Myokard: 16S rRNA (2,61 %), ND6 (10,90 %), COX1 (0,28 %) und MnSOD (1,06 %). Im Vergleich zwischen den Proben mit DCM und ICM konnten folgende Veränderungen festgestellt werden: 16S rRNA (6,62 %), ND6 (-9,57 %), COX1 (7,92 %) und MnSOD (3,34 %). Keine dieser Änderungen war statistisch signifikant (Abbildung 4-16).



	16S rRNA	COX1	ND6	MnSOD
Spender	1,62 ± 0,11	1,44 ± 0,09	1,19 ± 1,10	0,64 ± 0,05
Insuffizient (DCM+ICM)	1,67 ± 0,06	1,45 ± 0,05	1,32 ± 0,05	0,65 ± 0,02
DCM	1,72 ± 0,09	1,50 ± 0,07	1,26 ± 0,07	0,65 ± 0,04
ICM	1,61 ± 0,05	1,39 ± 0,05	1,40 ± 0,07	0,63 ± 0,03

**Abbildung 4-16: Ergebnisse der Quantifizierung der mRNA aus linken Ventrikeln gesunder und insuffizienter humaner Herzen:** a) Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs Spender vs. Insuffizient; b) Vergleich der Ergebnisse der insuffizienten Herzen DCM vs. ICM. Alle Werte sind als relative Einheiten ± SEM angegeben. (Insuffizient n = 42, Spender n = 10, DCM n = 23, ICM n = 19)

Bei der weiteren Charakterisierung der verwendeten humanen Proben konnten wir in unserer Arbeitsgruppe sowohl im Vergleich zwischen insuffizientem und gesundem Myokard, wie auch zwischen den Proben mit DCM und ICM signifikante Unterschiede in der Genexpression von Pro-ANP<sup>3</sup> und Pro-BNP<sup>4</sup> sowie TNF- $\alpha$ <sup>5</sup> zeigen (Scheubel *et al.*, 2002).

<sup>3</sup> atrial natriuretic peptide

<sup>4</sup> brain natriuretic peptide

ANP und BNP sind kardiale Hormone mit natriuretischen, vasodilatatorischen und Aldosteron-inhibierenden Eigenschaften. Beide Hormone werden vermehrt bei Krankheiten sezerniert, die zu einem erhöhten Herzzeitvolumen oder einer zunehmenden intravasalen Druckbelastung führen. ANP und BNP spielen eine wichtige Rolle bei der Natrium- und Blutdruckhomöostase.

<sup>5</sup> tumor necrosis factor  $\alpha$ : ein zu den Zytokinen gehörender, von Zellen des Makrophagen-/Monozyten-Systems



Dadurch wurde eine entzündliche Aktivierung der untersuchten Ventrikel nachgewiesen. Eine solche Inflammation kann zu Veränderungen der Genexpression und damit verbunden zu möglicherweise funktionellen Veränderungen in den Geweben führen. Derartige Änderungen waren in den hier untersuchten Proben jedoch nicht nachweisbar.

#### **4.4 Untersuchungen der mitochondrialen DNA mittels Southern-Blot-Analysen**

Die Untersuchungen der mitochondrialen DNA auf Quantität und Deletionen wurden an humanem Probenmaterial vorgenommen. Es wurde von sechs Spenderherzen und zwölf explantierten Herzen Gesamt-DNA isoliert, die circuläre mitochondriale DNA durch Restriktionsverdau linearisiert und dann, wie unter 3.7 beschrieben, für einen Southern Blot eingesetzt. Während des Restriktionsverdaus wird auch die nukleäre DNA in unterschiedlich große Fragmente geschnitten.

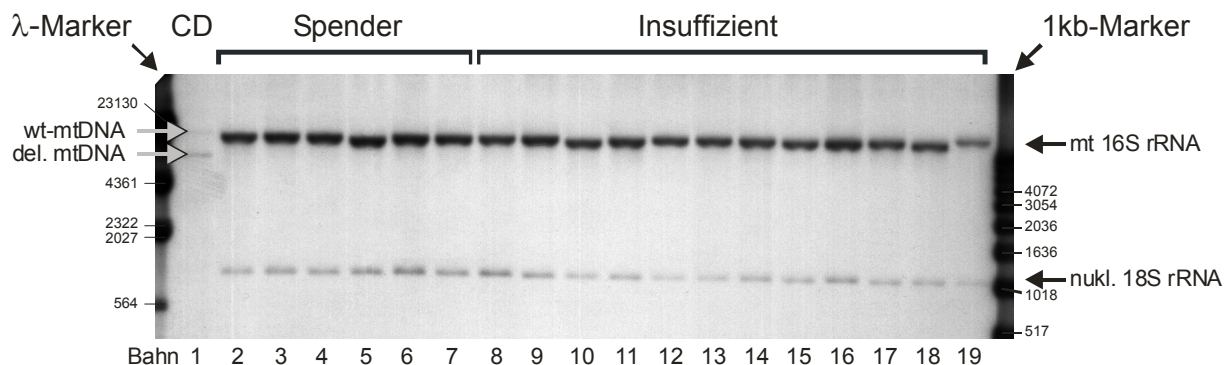
Die Hybridisierung erfolgte gleichzeitig mit zwei unterschiedlichen DIG markierten Sonden (PCR-Fragmente) (vgl. Tabelle 3-6). Zum einen kam eine Sonde für die mitochondriale 16S rRNA und eine weitere Sonde für die nukleäre 18S rRNA zum Einsatz. Es ergaben sich somit zwei Banden: für die linearisierte mitochondriale DNA (entspricht der Größe des mitochondrialen Genoms 16.569 bp) und die fragmentierte genomische DNA (ca. 1.200 bp) (Abbildung 4-17). Dadurch war es möglich, bei der späteren Auswertung einen Abgleich auf die nukleäre 18S rRNA durchzuführen, um eine eventuell ungleichmäßige Beladung der Slots mit DNA auszugleichen.

Für den Fall, dass eine Deletion der mitochondrialen DNA vorliegt, würde zusätzlich eine dritte Bande sichtbar sein, die aufgrund ihrer Deletion unterhalb der Wildtyp-mtDNA läuft. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit DNA eines Patienten aufgetragen, der klinisch durch eine *Common Deletion*, die 4977 bp umfasst (Corral-Debrinski *et al.*, 1992), charakterisiert war. Der Heteroplasmiegrad wurde auf ca. 70-80 % beziffert. Diese Probe stellte freundlicherweise die Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie zur Verfügung. In diesem Fall wurde deutlich weniger DNA auf das Gel aufgetragen (begrenzt Probenmaterial aus Skelettmus-

---

gebildeter Faktor. TNF- $\alpha$  ist ein zentraler Mediator der systemischen Entzündungs- u. Immunreaktion mit Wirkung auf eine Vielzahl von Targetzellen (Granulozyten, Endothelzellen, Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen); geringe Konzentrationen dienen der physiologischen Abwehr von Infektionen.

kelbiopsie), was sich insgesamt in schwächeren Banden widerspiegelt, die Bande der 18S rRNA war aus diesem Grund nicht mehr detektierbar (Bahn 1 in Abbildung 4-17).

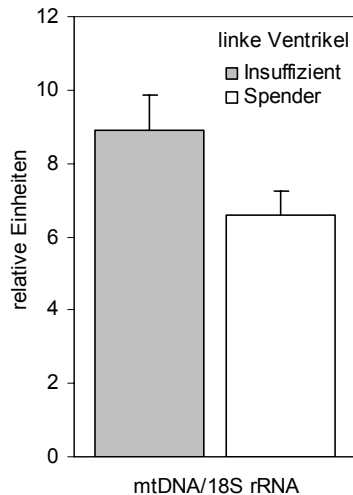


**Abbildung 4-17: Gelbild des Southern Blots von humanen Myokardproben:** Das Bild zeigt die zwei DNA-Banden der detektierten Sequenzen der mitochondrialen 16S rRNA, sowie der zum Abgleich verwendeten nukleären 18S rRNA. Bei der mit CD bezeichneten Probe (Bahn 1) handelt es sich um die mtDNA eines Patienten mit klinisch nachgewiesener *Common Deletion*. Hier ist die typische Doppelbande der Wildtyp-mtDNA und der durch die Deletion verkürzten mitochondrialen DNA gut erkennbar. (Insuffizient n = 12, Spender n = 6)

In den Bahnen 5, 10, 11 und 19 (Abbildung 4-17) war ein unterschiedliches Laufverhalten der Proben zu beobachten. Hier liegen jedoch keine Deletionen vor, da in diesen Bahnen die Bande der deletierten mitochondrialen DNA nicht nachweisbar war. Es handelt sich daher ausschließlich um Wildtyp-mtDNA. Alternativ müsste die gesamte mitochondriale DNA eine exakt gleich große Deletion aufweisen. Dies ist jedoch äußerst unwahrscheinlich. Diese Laufeffekte resultierten somit aus dem experimentellen Ablauf der Arbeiten.

Die Untersuchungen der DNA der Patienten mittels Southern Blot ergaben keine statistisch relevanten Unterschiede in der Quantität zwischen Spendermyokard und insuffizientem Myokard. In den Proben der explantierten Herzen konnte ein leicht erhöhter Anteil (35,4 %) der mitochondrialen DNA im Verhältnis zu den gesunden Spenderherzen festgestellt werden (Abbildung 4-18).

Die zusätzlich aufgetragene Probe des Patienten mit *Common Deletion* zeigt das zu erwartende typische Muster mit den zwei Banden des durch die Deletion verkürzten Ringes und der Wildtyp-mtDNA. Eine solche *Common Deletion* war in den anderen untersuchten Proben nicht nachweisbar. Dies lässt auf eine intakte mitochondriale DNA sowohl in den insuffizienten Herzen als auch in den Spenderherzen schließen.



	mtDNA/18S rRNA
Insuffizient	8,92 ± 0,93
Spender	6,58 ± 0,67
p	> 0,05

**Abbildung 4-18: Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung der mitochondrialen und nukleären DNA von humanen Myokardproben:** Die Messergebnisse der mitochondrialen DNA wurden auf die nukleäre DNA abgeglichen. Alle Werte sind als relative Einheiten ± SEM angegeben.

Diese Experimente zur Quantität und Qualität der mitochondrialen DNA wurden später im Institut für Pathophysiologie auch an Tiermodellen fortgeführt. Ein Insuffizienzmodell mit jungen und alten Ratten wurde hinsichtlich der *Common Deletion* untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass keine *Common Deletion* in den alten Tieren nachweisbar war (Rohrbach *et al.*, unveröffentlicht). Dies deckt sich mit den oben aufgeführten Befunden der Untersuchungen der humanen insuffizienten Herzen.

Weiterhin wurde in Anlehnung an die Versuche von Ide (Ide *et al.*, 2001) in einem Postinfarktmodell in Mäusen die mitochondriale DNA untersucht. Auch in diesem Fall waren keine Veränderungen nachweisbar (Rohrbach *et al.*, unveröffentlicht).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Wie verhalten sich die funktionellen Parameter der Mitochondrien im Alter?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mitochondrien aus Herz- und Skelettmuskulatur in permeabilisierten Muskelfasern oder in Homogenaten auf ihre funktionellen Eigenschaften untersucht. Die Bestimmung dieser funktionellen Parameter erforderte grundsätzliche Überlegungen zur methodischen Herangehensweise. So schwellen isolierte Mitochondrien in Abhängigkeit von den verwendeten Medien an und weisen somit nur eine begrenzte Stabilität auf. Weiterhin treten hohe Präparationsverluste bei der Isolation von Mitochondrien auf, die bis zu 90 % betragen können (Gellerich *et al.*, 1995; Gellerich *et al.*, 1997). Auch eine durch die Präparation bedingte Auswahl bestimmter Mitochondriensubpopulationen ist nicht ausgeschlossen, da z.B. ischämisch veränderte Mitochondrien aufschwellen können, schlechter sedimentieren und sich damit der Untersuchung entziehen (Sordahl *et al.*, 1980).

Durch die Untersuchung der Funktion der Mitochondrien im nativen Muskel ist es möglich, die oxidative Phosphorylierung als Gesamtprozess zu untersuchen, da die Bestimmung der Aktivitäten einiger Enzyme nur in intakten Mitochondrien möglich ist (Gellerich *et al.*, 1997). Wie schon unter 3.1.1 beschrieben, zeigt die Untersuchung der Mitochondrienfunktionen in der permeabilisierten Muskelfaser viele Vorteile. Unter den geschilderten Bedingungen kann es zu keiner künstlichen Selektion mitochondrialer Subpopulationen kommen und die gemessenen mitochondrialen Funktionsparameter spiegeln die Eigenschaften aller Mitochondrien der untersuchten Proben wieder. Weiterhin bleiben die Mitochondrien innerhalb der Muskelfaser weitgehend intakt, wogegen bei der Isolation die Mitochondrien durch den Präparationsstress geschädigt werden können. Derartige Schädigungen der mitochondrialen Außenmembran durch Isolationsstress wurden von Borutaite *et al.*, 1996 und Toleikis *et al.*, 1996 gezeigt. Diese Schäden treten in der permeabilisierten Muskelfaser nicht auf (Kay *et al.*, 1997; Saks *et al.*, 1998). Die deutlich verlängerte Stabilität der Fasern im speziellen Storagepuffer auf Eis ermöglicht eine Lagerungszeit bis zu 34 Stunden (Gellerich *et al.*, 1997) und somit die Überführung der Proben vom Ort der Gewinnung in die mit Oxygraphen ausgestatteten Labore. Da akute oder genetisch bedingte Schäden an Mitochondrien nicht homogen über ein Organ verteilt sind und die Fasern unterschiedliche Mitochondriengehalte (Mikroheterogenitäten) (Gellerich *et al.*, 1995) aufweisen können, wurden alle Messungen mindestens an drei ver-

schiedenen Faserbündeln durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise konnten weiterhin mögliche geometrische Diffusionsprobleme beachtet werden, die in einer permeabilisierten Muskelfaser aufgrund unterschiedlich großer Muskelzellen (z.B. im Myokard) auftreten können. Weiterhin wurde durch die Skalierung der Pyruvatatmung auf die Succinatatmung in der gleichen Faser ein innerer Referenzwert erzeugt, der vom Mitochondriengehalt unabhängig war. So konnte man differenzieren, ob eine verminderte Pyruvatatmung die Folge eines Komplex I-Defektes war oder einfach die Folge eines verminderten Mitochondriengehaltes in der untersuchten Faser. Bei Patienten mit Schädigungen der mitochondrialen DNA, bei Sepsis und Tumorbildung vermindert sich die SRPR signifikant (Gellerich *et al.*, 2004). Die *skinned fiber*-Technik erwies sich damit als geeignete Methode zur Bestimmung funktioneller mitochondrialer Parameter.

Die von Ide (Ide *et al.*, 2001) gezeigte Disproportionalität der Atmungskette konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl für den direkten Vergleich zwischen jungen und alten Tieren (Mikrorespirometrie und Enzymaktivitäten), sowie zwischen Patienten mit DCM/ICM und Organspendern (Enzymaktivitäten) nur zum Teil bestätigt werden.

Die Pyruvat-abhängige *State 3*-Atmung war in den Proben der alten Tiere um 54,39 % im LV und im M. soleus um 49,88 % im Vergleich zu den jungen Tieren jeweils hochsignifikant erniedrigt. Dies ist jedoch nur teilweise durch eine Verminderung der Anzahl der Mitochondrien bedingt, die durch die Aktivität der Citratsynthase bestimmt wurde (vgl. 3.2.2).

Das Verhältnis zwischen Komplex I (Pyruvat/Malat)- und Komplex II (Succinat) abhängiger Atmung (SRPR) wurde in der gleichen Muskelfaser bestimmt. Im LV war die SRPR um 16,43 % und im M. soleus um 25,13 % in den alten Tieren im Vergleich zu den jungen Tieren jeweils signifikant erniedrigt. Daraus ergab sich für die *Pyruvat Related Succinat Respiration* (PRSR) ein entsprechender Anstieg der Werte im LV um 25,17 % und im M. soleus um 39,37 %.

Diese Ergebnisse zeigen damit sowohl eine signifikante Erniedrigung der Aktivitäten von Komplex I im Alter in beiden untersuchten Geweben, als auch eine Verringerung der Aktivität von Komplex I im Verhältnis zu Komplex II der mitochondrialen Atmungskette. Um die hier gefundene relative Abnahme der Komplex I-Aktivität experimentell abzusichern, wurden zusätzliche Untersuchungen mit einer weiteren Methode durchgeführt.

Die spektralphotometrische Untersuchung der Enzymaktivitäten der Komplexe der Atmungskette wurde in Homogenaten von in Stickstoff eingefrorenen Gewebeproben durchgeführt. Die auf das Feuchtgewicht bezogenen Aktivitäten der Atmungskettenenzyme (Komplex I -28,66 % und -39,65 %, Komplex I + III -37,86 % und -41,90 %, Komplex II + III -15,00 %

und -20,66 %, Komplex III -5,58 % und -25,07 %, COX -5,04 % und -24,46 % jeweils in LV und M. soleus alt vs. jung ) bestätigten die respirometrischen Daten. Das Verhältnis von Komplex I + III/Komplex II + III erniedrigte sich im LV um 29,18 % und um 23,43 % im M. soleus. Die KIII-RNO war im LV um 36,78 % und im M. soleus um 20,71 % erniedrigt. Demgegenüber stand die relative Erhöhung von KII + III/KI+KIII sowohl im LV um 45,04 % als auch im M. soleus um 31,37 %.

In den Proben des humanen Myokards konnten aufgrund von Art und Zeitpunkt der Probenentnahme während der Herztransplantationen und der anschließenden sofortigen Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff keine mikrorespirometrischen Daten erfasst werden. Durch den Vorgang des Einfrierens kann für die Intaktheit der zellulären Strukturen keine Garantie gegeben werden. Proben für die mikrorespirometrische Untersuchung müssen jedoch nach der Entnahme sofort im Storagepuffer gelagert werden. Dies war aus logistischen und technischen Gründen nicht möglich.

Die Methodik wurde in der Zwischenzeit weiter verfeinert und es ist nun möglich auch mit kleineren Probenmengen mikrorespirometrische Untersuchungen durchzuführen. Damit können nun auch Untersuchungen an Patienten durchgeführt werden, denen während eines herzchirurgischen Eingriffs Biopsien entnommen werden. Der Umfang des zu untersuchenden Personenkreises erweitert sich dadurch stark. Voraussetzung für den Erhalt dieses Biopsiematerials ist ein positives Votum der Ethikkommission. Bislang sind solche Untersuchungen noch nicht durchgeführt worden.

Die durch die spektralphotometrischen Bestimmungen der Enzymaktivitäten in humanem Myokard gewonnenen Ergebnisse zeigen analoge Tendenzen wie die Untersuchungen im Tiermodell. Die Enzymaktivitäten (bezogen auf das Feuchtgewicht) waren von Komplex I um 33,2 %, von Komplex I + III um 25,9 %, von Komplex II + III um 4,4 %, von Komplex III um 11,6 % und von COX um 20,2 % (Insuffizient vs. Spender) zum Teil signifikant erniedrigt. Sie bestätigen zum einen die im Tiermodell gewonnenen Daten und lassen andererseits darauf schließen, dass bei einer technisch möglichen respirometrischen Untersuchung der humanen Proben ähnliche Ergebnisse zu erwarten sind.

In Makrophagen-Zelllinien induziert Stickstoffmonoxid (NO) eine kompetitive, schnell reversible Hemmung von Komplex IV, die zu einer erhöhten Bildung von Radikalen an den vorgeschalteten Komplexen führt (Moncada *et al.*, 2002; Clementi *et al.*, 1998). In Zuständen von verminderten antioxidativen Schutzmechanismen kann die Kombination aus Stickstoffmonoxid und erhöhter mitochondrialer Superoxidanionenbildung zu einem sich langsam entwickelnden, irreversiblen Abfall der Komplex I-Aktivität führen. Möglich ist dies durch die

Bildung von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) aus Stickstoffmonoxidradikal und dem *in vivo* ubiquitär durch die NADPH-Oxidase gebildeten Superoxid-Radikal ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ). Sowohl  $\text{O}_2^{\bullet}$  als auch NO gehören zu den reaktiven, instabilen Radikalen, die äußerst schnell zu Peroxynitrit als Hauptprodukt reagieren. Diese Reaktion läuft etwa dreimal schneller ab als die Dismutierung von  $\text{O}_2^{\bullet}$  durch Superoxiddismutase. Diese Befunde lassen sich jedoch nicht uneingeschränkt auf die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse übertragen, da neben der signifikanten Erniedrigung der Aktivität von Komplex I keine Veränderungen der Aktivitäten von anderen Komplexen der mitochondrialen Atmungskette festgestellt wurden.

Weiterhin ist eine S-Nitrosylierung von bislang nicht identifizierten Targetmolekülen mit Komplex I denkbar, wobei andere Komplexe unbeeinflusst bleiben (Moncada *et al.*, 2002; Clementi *et al.*, 1998). Diese Faktoren wurden in insuffizientem Myokard bisher noch nicht untersucht. Alle Voraussetzungen für diese mögliche Reaktion sind gegeben. Eine erhöhte Stickstoffmonoxidbildung in erkranktem Myokard wurde gezeigt (Drexler *et al.*, 1998). Stickstoffmonoxid ist ein starker Inhibitor von Komplex IV im Myokard (Forfia *et al.*, 1999) und erhöhter oxidativer Stress in krankem Myokard auf Grund mitochondrialer und extramitochondrialer Mechanismen wurde nachgewiesen (Hare, 2001; Saavedra *et al.*, 2002; Ide *et al.*, 1999).

Der Mangel an Komplex I kann funktionelle Konsequenzen für die Bildung von ATP und die mitochondriale Radikalbildung haben. Eine Hemmung des mitochondrialen Komplexes I in mehreren Stufen durch verschiedene Mechanismen stört die maximale Atmungskapazität (Barrientos *et al.*, 1999). Aus diesen Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass die in dieser Arbeit gezeigte 27 %ige Erniedrigung der Aktivität von Komplex I bezogen auf die Aktivität der Citratsynthase im kranken Myokard eine 15 %ige Erniedrigung der Maximalatmung zur Folge hat (Barrientos *et al.*, 1999).

Die Atmungskapazität im kranken humanen Herzen wird weiterhin durch den mitochondrialen Verlust von Cytochrom c (Scheubel *et al.*, 2001) sowie möglicherweise durch eine reversible Hemmung von Komplex IV durch erhöhte Stickstoffmonoxidbildung abgeschwächt (Forfia *et al.*, 1999). Somit sind mehrere Mechanismen für eine primäre Abschwächung der mitochondrialen ATP-Synthese identifiziert, welche eine reduzierte Atmungskapazität in der permeabilisierten Muskelfaser in krankem Myokard bei Maximalatmung (*State 3*) erklären, obwohl genügend Substrat für Komplex I zur Verfügung steht (Sharov *et al.*, 2000). Diese Reduktion der mitochondrialen Atmungskapazität wird als Ursache für die gezeigte erniedrigte myokardiale Konzentration an Phosphokreatin und ATP betrachtet (Recchia *et al.*, 1998) und kann der Grund für eine erhöhte Endothelin-1-Bildung sein (Kakinuma *et al.*, 2001;

Morawietz *et al.*, 2000). Diese erhöhte Endothelin-1-Expression resultiert aus einer Induktion von HIF-1 $\alpha$ <sup>1</sup> aufgrund eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels und kann durch eine Inhibierung von Komplex I nachgeahmt werden (Kakinuma *et al.*, 2001; Yuhki *et al.*, 2001). Mitochondriale Veränderungen, die mit Erkrankungen des Herzen verbunden und den Atmungskettenkomplexen nachgelagert sind, wie z.B. die Reduktion der mitochondrialen Kreatinkinase (Ye *et al.*, 2001) und der Kreatintransporter (Neubauer *et al.*, 1999) können möglicherweise durch einen Adenylatkinase katalysierten Phosphotransfer kompensiert werden (Gellerich *et al.*, 1994; Dzeja *et al.*, 1999).

Der durch die Hemmung mit Rotenon oder durch eine verringerte mitochondriale Genexpression bei Mitochondriopathien verursachte Mangel an Komplex I führt zu einer erhöhten mitochondrialen Bildung von Superoxidanionen (Pitkanen *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997). In gleicher Weise ist der Komplex I eine Quelle erhöhter mitochondrialer Radikalbildung, wenn im experimentellen Herzversagen ein ähnliches Niveau der Verminderung von Komplex I erreicht wird, wie in den hier verwendeten humanen Proben (Ide *et al.*, 1999), wobei die Mechanismen der Komplex I-Erniedrigung unterschiedlich erscheinen.

Abgesehen von Fällen von Kardiomyopathien wurden selten Vergleiche der Atmungskettenaktivität zwischen gesundem und krankem Myokard durchgeführt. In explantierten linken Ventrikeln von Patienten mit DCM wurde eine starke Abnahme der NADH-Cytochrom-c-Reduktase-Aktivität (Komplex I + III) um 61 % im Vergleich zum Spendermyokard gezeigt, wobei die NADH-Q-Reduktase-Aktivität (Komplex I) normal war (Jarreta *et al.*, 2000). Dieser Umstand ist schwer zu verstehen, da die NADH-Cytochrom-c-Reduktase Aktivität exklusiv von der Komplex I-Aktivität abhängt (Trounce *et al.*, 1996). In einem experimentellen Modell in dem mit *tachypacing* Herzfehler ohne Einsatz von Medikamenten induziert wurden, konnte eine Verminderung der Aktivitäten der Komplexe III und V, welche mitochondrial codierte Untereinheiten enthalten, sowie der mitochondrialen ATPase beobachtet werden (Marin-Garcia *et al.*, 2001). Dabei zeigte sich eine gestörte mitochondriale Genexpression ähnlich den Arbeiten im Mausmodell von Ide (Ide *et al.*, 2001). Beide Modelle, in unterschiedlichen Spezies und jeweils ohne den Einsatz von Medikamenten, zeigen eine disproportionale Atmungskette als Resultat einer gestörten mitochondrialen Genexpression (Ide *et al.*, 2001; Marin-Garcia *et al.*, 2001). Andererseits weisen die Ergebnisse von explantierten Her-

---

<sup>1</sup> eine Untereinheit von HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), welche unter Sauerstoffmangelbedingungen aktiviert wird



zen aus Patienten, denen ein etablierter Medikamenteneinsatz bei terminaler Herzinsuffizienz zu Teil wurde, auf eine protektive Rolle dieser Medikation gegen Störungen der mitochondrialen Genexpression hin.

Aktuelle Arbeiten aus dem Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zeigen Effekte einer kalorischen Restriktion auf die Aktivitäten der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette. Es wurde die Auswirkung kurzzeitiger moderater kalorischer Restriktion (-40 % über acht Wochen) an jungen (vier bis sechs Monate) und ca. zwei Jahre alten Sprague-Dawley-Ratten untersucht. In der Gruppe der alten Tiere ohne kalorische Restriktion war die Aktivität von Komplex I im linken Ventrikel signifikant erniedrigt. Unter kalorischer Restriktion jedoch normalisierten sich die Enzymaktivitäten der Komplexe der Atmungskette der alten Ratten auf das Niveau der jungen Tiere. In den jungen Ratten mit kalorischer Restriktion blieben die Enzymaktivitäten unverändert. Die Mortalität war in beiden Versuchsgruppen gleich hoch. Die hier nachgewiesene Reversibilität einer mitochondrialen Dysfunktion unter kalorischer Restriktion zeigt, dass funktionelle Änderungen innerhalb der Atmungskette der Mitochondrien als ein primärer pathophysiologisch relevanter Mechanismus im Alter anzusehen sind.

## **5.2 Ändert sich im Alter die Expression mitochondrial codierter Gene?**

Der Circulus Vitiosus des mitochondrialen Alterns besagt, dass altersabhängige mtDNA-Schäden durch eine disproportionalen Atmungskette hervorgerufen werden, was wiederum zu einer erhöhten mitochondrialen Radikalbildung führt. Diese Hypothese wurde insoweit angefochten, dass eine vollständige Unterdrückung der mtDNA-Expression keinen Aufbau der Komplexe der Atmungskette erlauben würde (Bai *et al.*, 1998).

Die Bildung einer disproportionalen Atmungskette wurde jedoch in einem Mausmodell mit terminaler Herzinsuffizienz nach Infarkt demonstriert (Ide *et al.*, 2001), bei der erhöhter oxidativer Stress gezeigt wurde (Tsutsui *et al.*, 2001). Im kranken Myokard dieser Mäuse war die Menge der Wildtyp-mtDNA und der mtDNA-Transkripte wesentlich geringer, sowie die Enzymaktivitäten der mitochondrialen Komplexe, welche die mitochondrial codierten Proteinuntereinheiten enthalten. Der nur nukleäre Untereinheiten enthaltende Komplex II hingegen war normal. Hier zeigt sich das Bild einer disproportionalen Atmungskette, welches durch die o.g. Hypothese gezeichnet wird. Dies ist jedoch nur im Mausmodell mit extrem großen Myo-

kardinfarkten nachweisbar (Ide *et al.*, 2001). Trotzdem ist dieses Mausmodell ein Beweis dafür, dass die Bildung einer disproportionalen Atmungskette möglich ist, wenn mitochondriale DNA durch oxidativen Stress beschädigt wird (Ide *et al.*, 2001).

Zur Untersuchung der Genexpression in den vorliegenden Versuchen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Bei den Experimenten an den Myokardproben der Ratten kam die kompetitive standardkalibrierte RT-PCR zum Einsatz. Diese ermöglicht es, sehr exakte Aussagen über die Genexpression zu liefern, indem mathematisch die Anzahl der Moleküle berechnet werden kann. Voraussetzung für diese Methode ist jedoch das Vorhandensein von großen Mengen an Probenmaterial, da pro Messung vier bis fünf Ansätze erforderlich sind. Dies war bei den o.g. Versuchsreihen gegeben. Dadurch war es möglich, für die in diesen Proben zu untersuchenden Gene die mRNA-Expression in Absolutwerten (amol/ $\mu$ g Gesamt-RNA) zu ermitteln. Bei der Bearbeitung der Proben des humanen Myokards konnte dieser großzügige Materialeinsatz nicht realisiert werden. Aus diesem Grund wurde hier auf die Methode der semiquantitativen RT-PCR zurückgegriffen. Diese ermöglicht ebenfalls eine sehr genaue Untersuchung der Genexpression, kann jedoch keine Absolutwerte liefern.

Die gezeigten Arbeiten ergaben in den Proben des Myokards der Ratten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zwischen jungen und alten Tieren (vgl. Abschnitte 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3). Dies betraf sowohl die untersuchten Gene der drei mitochondrialen Primärtranskripte (12S rRNA, COX1 und ND6), als auch das jeweils zum Vergleich herangezogene kerncodierte Gen ( $F_0F_1$ -ATPase). Lediglich in den linken Ventrikeln der Fisher-L-NAME-Ratten war die mRNA der kerncodierten  $F_0F_1$ -ATPase signifikant erniedrigt. Dieser einzelne signifikante Befund vermag das generell vorgefundene Bild der Genexpression jedoch nicht zu beeinträchtigen. Die unterschiedlich starke Transkription der drei einzelnen mitochondrialen Primärtranskripte konnte in allen Experimenten nachvollzogen werden (Clayton, 1991; Clayton, 1992). Die von Ide (Ide *et al.*, 2001) im Mausinfarktmodell gezeigten signifikanten Änderungen der Expression der mitochondrial codierten Gene konnten in den von uns untersuchten Tieren nicht nachvollzogen werden. Während Ide diese Werte in Geweben von Mäusen mit großen Infarkten erhob, ist davon auszugehen, dass ein solcher Schweregrad einer Schädigung des Myokards im Alter nicht erreicht wird.

Auch in den Proben humaner Herzen, die Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz entnommen wurden, konnten solche starken Schäden der mitochondrialen DNA und Störungen der Genexpression nicht aufgezeigt werden (Scheubel *et al.*, 2002), obwohl hier eine verringerte Aktivität von Komplex I im Verhältnis zu den anderen Komplexen der mitochondrialen At-

mungskette gefunden wurde. Die Hauptunterschiede zwischen den insuffizienten Herzen der untersuchten Patienten und dem oben aufgeführten Mausmodell sind der Verlauf der Krankheit und der Schweregrad der Dekompensation, welcher wahrscheinlich durch das schnelle Fortschreiten im experimentellen Mausmodell mit sehr großen Infarkten maximal sein wird. Weiterhin wären Kleintierinfarkte dieser Größenordnung beim Menschen mit Sicherheit letal und große Infarkte sind bei Patienten generell mit kardioprotektiver Medikation verbunden.

Eine kritische Komponente bei der Untersuchung von humanem Myokard ist die Verwendung von nicht erkranktem Spendermaterial als Kontrolle. Im Anschluss an den Hirntod, vor der Entnahme der Organe, kommt es in den Spenderherzen zu einer schweren inflammatorischen Reaktion, die an der erhöhten Expression von Interleukin-6 und anderen Cytokinen erkennbar ist (Birks *et al.*, 2000; Plenz *et al.*, 2002). Die in der Arbeit von Birks und Plenz verwendeten Spenderherzen hatten, verglichen mit Myokardbiopsien ohne histologische Anzeichen einer Inflammation, eine erhöhte Interleukin-6 Expression, die auf eine solche inflammatorische Aktivierung schließen lässt. Die mitochondriale Genexpression in den Biopsien war jedoch nicht höher als die der Spenderherzen, was gegen eine inflammatorisch hervorgerufene Erniedrigung der mitochondrialen Genexpression in den hier verwendeten Spenderherzen spricht. Diese inflammatorischen Anzeichen haben somit keine Auswirkungen auf die mitochondriale Genexpression.

Eine retrospektive Analyse der hier verwendeten terminal insuffizienten explantierten Herzen von Patienten mit  $\beta$ -Blocker<sup>2</sup> Therapie (n = 25) vor der Operation und Patienten ohne diese Therapie (n = 18) zeigte in beiden Gruppen einen ähnlichen Schweregrad der Erkrankung. Dargestellt wurde dies durch die Expressionsuntersuchungen von Pro-ANP und Pro-BNP (Scheubel *et al.*, 2002; siehe 4.3.4). Es gab in keiner der beiden Untergruppen signifikante Unterschiede in den erhobenen hämodynamisch funktionellen Parametern. Trotzdem hatten die Patienten mit  $\beta$ -Blocker Therapie eine 20 % höhere Komplex III-Aktivität verglichen mit den Patienten ohne Therapie. Dies kann als Zeichen eines protektiven Effekts der  $\beta$ -Blocker Therapie auf die mitochondriale Funktion in kranken Herzen gedeutet werden. Eine ähnliche

---

<sup>2</sup> Betarezeptorenblocker:  $\beta$ -Rezeptoren blockierende Substanzen. Hemmen die Wirkung von  $\beta$ -Sympathomimetika, vor allem des Noradrenalins. Diese Medikamentengruppe bremst die Überaktivität des sympathischen Nervensystems und senkt die dadurch verursachten erhöhten Blutdruckwerte sowie auch die meist gleichzeitig erhöhte Herzfrequenz.

Beobachtung dieses  $\beta$ -Blocker-vermittelten mitochondrialen Schutzes konnte schon bei der retrospektiven Analyse der Untersuchungen zur Aktivierung von Apoptose gemacht werden (Scheubel *et al.*, 2001).

In der Gruppe der Patienten mit DCM im Vergleich zur ICM fand sich eine signifikant erhöhte Expression von Pro-ANP verbunden mit einer stärkeren hämodynamischen Dekompensation. Es konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der mitochondrialen Genexpression und der Aktivität der Enzyme der mitochondrialen Atmungskette festgestellt werden.

Eine weitere retrospektive Gruppierung der Patienten mit terminal insuffizienten Herzen nach einer ACE-Inhibitor<sup>3</sup> / AT1-Blocker<sup>4</sup> Therapie (n = 37) mit solchen ohne Therapie (n = 6) zeigte bei ersteren eine signifikant geringere TNF- $\alpha$  Expression, jedoch keine Veränderung der funktionellen Parameter der Komplexe der Atmungskette (Scheubel *et al.*, 2002).

### **5.3 Gibt es Veränderungen in Quantität und Qualität der mtDNA im Alter?**

Zufällig gebildete Störungen in einer dynamischen Population von mitochondrialen Genomen können durch klonale Expansion auf unterschiedliche Zellen verteilt werden. Dies erfolgt in Mitochondrien alter Gewebe und konnte in Langzeitstudien (Michikawa *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001) und Einzelzellanalysen unter geeigneten methodischen Vorkehrungen (Bodyak *et al.*, 2001; Khrapko *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2001; Coller *et al.*, 2001; Nekhaeva *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002) gezeigt werden. Diese Verteilung der mtDNA-Mutationen in einzelnen Zellen kann zu einer 100 %igen Ansammlung innerhalb der Population der mitochondrialen Genome führen, wodurch die Wildtyp-DNA vollständig ersetzt wird. Man bezeichnet dies als „Verlust der Heteroplasmie“ (Nekhaeva *et al.*, 2002). Diese Experimente zeigen, dass das Altern der mitochondrialen DNA ein Niveau erreichen kann, bei dem es eine Relevanz für die Ausprägung des mitochondrialen Phänotyps hat. Sie zeigen jedoch nicht, ob Mutationen mit schädigenden Effekten auf die mitochondriale Funktion ebenfalls dieses Niveau erreichen können.

---

<sup>3</sup> ACE-Inhibitor: Inhibitoren des angiotensin converting enzyme, das Angiotensin I in Angiotensin II überführt; bewirken Blutdrucksenkung.

<sup>4</sup> Über AT1-Rezeptoren erzeugt Angiotensin II eine Verengung der Gefäße und somit eine Steigerung des Gefäßwiderstandes und des Blutdrucks. AT1-Blocker blockieren die Wirkungen von Angiotensin II und wirken somit gefäßerweiternd und blutdrucksenkend.

Frühe Ausführungen zum mitochondrialen Altern gingen davon aus, dass es innerhalb der Mitochondrien keine DNA-Reparaturmechanismen gebe. Später zeigte sich jedoch, dass diese Annahme falsch war (Bohr *et al.*, 1999; Shadel *et al.*, 1997). Die zur Reparatur benötigten Enzyme (Glycolasen, Endonucleasen und DNA-Ligasen) müssen in die Mitochondrienmatrix importiert werden. Für bestimmte Gene der DNA-Glycolasen wurden Splicevarianten nukleärer und mitochondrialer Isoformen mit mitochondrialen Importsignalen identifiziert (Otterlei *et al.*, 1998; de Souza-Pinto *et al.*, 2001). Die Eliminierung der für die durch oxidativen Stress verursachten DNA-Schäden zuständigen Reparaturenzyme führt zu einer Ansammlung von mtDNA-Schäden (de Souza-Pinto *et al.*, 2001; Lakshmiathy *et al.*, 2001; Druzhyna *et al.*, 2000). Die Generierung einer homozygoten knock-in Maus, mit einer Replikationskompetenten jedoch Reparatur-inkompetenten (*proof reading deficient*) Variante von PolgA, der kerncodierten katalytischen Untereinheit der mtDNA-Polymerase, führt zur Ausbildung eines veränderten mtDNA-Phänotyps (Trifunovic *et al.*, 2004). Dieser weist ein drei- bis fünffach erhöhtes Niveau von Punktmutationen sowie eine erhöhte Menge an deletierter mitochondrialer DNA auf. Diese Erhöhung der somatischen mtDNA-Mutationen geht einher mit einer reduzierten Lebenserwartung und einer vorzeitigen Ausbildung von alterstypischen Phänotypen, wie Gewichtsverlust, reduziertem Unterhautfett, Haarverlust, Osteoporose und einer Vergrößerung des Lumens des linken Ventrikels (Trifunovic *et al.*, 2004). Diese Resultate lassen eine ursächliche Verbindung zwischen mtDNA-Mutationen und alterstypischen Phänotypen erkennen, erklären jedoch nicht die in dieser Arbeit gezeigte globale Depression der Aktivität von Komplex I. Aufgrund der durch zufällige Punktmutationen veränderten mitochondrialen DNA dürfte dann nicht ausschließlich Komplex I in seiner Aktivität verändert sein, sondern auch andere Komplexe der mitochondrialen Atmungskette.

Die von Ide (Ide *et al.*, 2001) gezeigten signifikanten Änderungen in der Genexpression der mitochondrial codierten Gene im Mausmodell wurden auf eine Verminderung der Anzahl der mitochondrialen Genome zurückgeführt. Eine solche Verminderung wurde auch schon mit der Pathogenese mitochondrialer Erkrankungen und mit einer durch Zidovudin (Azidothymidin; kurz AZT) induzierten Myopathie in Verbindung gebracht (Moraes *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1992). Da eine Veränderung der Genexpression in den hier untersuchten Fällen als potentieller Grund für die veränderten Enzymaktivitäten der Komplexe der Atmungskette im Alter und im insuffizienten Myokard nicht mehr in Frage kommt, sollten aus den Untersuchungen der mitochondrialen DNA weitere Erkenntnisse bezogen werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen an der mitochondrialen DNA humaner Proben sollten bezüglich zweier Fragestellungen Antworten erbringen. Zum einen, ob es in insuffizientem Myokard zu einer

Veränderung der Quantität der mitochondrialen DNA (*mtDNA-copy-number*) kommt und zum zweiten, ob die mitochondriale DNA durch Alter und Krankheit in ihrer Qualität beeinflusst ist.

Die unter 4.3 dargestellten Ergebnisse zeigen eine unveränderte Expression der mitochondrial codierten Gene sowohl im Alter als auch im insuffizienten Myokard und sind damit nicht für die gestörte Aktivität der Enzyme der Atmungskette verantwortlich. Sie lassen jedoch keine Rückschlüsse darüber zu, ob die zu transkribierende DNA ebenfalls in ihrer Menge unverändert vorliegt, oder ob gegebenenfalls eine veränderte Anzahl mtDNA-Kopien durch kompensatorische Mechanismen auf transkriptionaler Ebene ausgeglichen wird. Wie unter 4.4 gezeigt, sind zwischen den Proben des Spendermyokards und des insuffizienten Myokards keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die experimentell gefundene leichte Erhöhung der Menge der mitochondrialen DNA in den Proben der insuffizienten Patienten stand primär gegen die vor Versuchsbeginn gestellten Erwartungen. Sie ist möglicherweise auf eine kompensatorische Steigerung der Replikationsrate zurückzuführen. Die Expression des kerncodierten mitochondrialen Transkriptionsfaktors war ebenso wie die unter 4.3.4 gezeigte Expression der mitochondrial codierten Gene unverändert. Eine mögliche Erklärung für die leicht erhöhte *mtDNA-copy-number* bei unveränderter Genexpression sind möglicherweise Defekte der mitochondrialen DNA die durch Mutationen oder Deletionen entstanden sind und eine Transkription der betroffenen mtDNA-Ringe nicht zulassen. Als regulatorischer Ausgleich wäre somit eine Erhöhung der Menge an DNA Molekülen denkbar.

Um die Möglichkeit o.g. Schädigungen der mitochondrialen DNA nachzuweisen, wurde im Southern Blot zusätzlich die Probe eines Patienten mit einer klinisch nachgewiesenen *Common Deletion* als Referenz aufgetragen. Die bei diesem Patienten gefundene Doppelbande der deletierten und undeletierten mitochondrialen DNA war weder bei den Proben des gesunden noch bei den Proben des insuffizienten Myokards nachweisbar. Die gefundenen Banden lassen somit Rückschlüsse auf eine weitgehend intakte mitochondriale DNA zu.

Die am Anfang des Kapitels dargestellten Arbeiten mit nachgewiesenen Veränderungen der mitochondrialen DNA im Alter, können die hier gefundenen Ergebnisse damit nicht erklären. Durch die Verwendung von modifizierten Nukleotiden, die bei der Herstellung der Sonde in die Nukleinsäure eingebaut wurden und nach der Hybridisierung mit Hilfe von Enzym-Antikörper-Konjugaten nachgewiesen wurden, konnte beim Southern Blot eine hohe Sensitivität erreicht werden, die jedoch nicht an die Sensitivität radioaktiver Methoden heranreicht. Dies ist hauptsächlich durch hohe Hintergrundsignale nach der Hybridisierung bedingt. Für die gegebene Fragestellung erwies sich die Methode jedoch als geeignet, da sie in der klini-

schen Diagnostik routinemäßig eingesetzt wird und die zusätzlich aufgebrauchte Kontrollprobe mit *Common Deletion* die vorhandenen Schäden der mitochondrialen DNA deutlich zeigt.

## 5.4 Offene Fragen und Aspekte des mitochondrialen Alterns

Während des Alterns kommt es zu einer Erniedrigung der Masse und Funktion von Geweben des Herzens, des Gehirns und der Skelettmuskulatur. Die biologischen Ursachen für das Altern werden derzeit noch kontrovers diskutiert. Den Mitochondrien wird hier nicht nur eine Schlüsselstellung im Energiestoffwechsel eingeräumt, sondern auch eine fundamentale Bedeutung für Leben, Pathologie und Tod beigemessen. So sind geschädigte Mitochondrien die pathophysiologische Ursache für zahlreiche Krankheiten (MiMyCa: Mitochondriale Myopathie und Kardiomyopathie; Mitochondriale Myopathie; MELAS: Mitochondriale Myopathie, Encephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfallähnliche Ereignisse; MERRF: Myoklonusepilepsie mit *ragged-red fibers*; Lebersche Optikus-Neuropathie; siehe: United Mitochondrial Disease Foundation; <http://www.umdf.org>). Im Jahre 1977 wurde für neuromuskuläre Syndrome, die durch strukturell oder funktionell alterierte Mitochondrien im Muskel oder Gehirn gekennzeichnet sind, der Begriff „mitochondriale Enzephalomyopathien“ geprägt (Shapira *et al.*, 1977).

Das Altern wird daher auch von mitochondrialen Änderungen begleitet. Akkumulierende Schäden der mitochondrialen DNA gelten als ein Merkmal des normalen Altersmyokards und als mögliche Ursache für eine verstärkte mitochondriale Radikalbildung, eine respiratorische Funktionseinschränkung und eine erhöhte Freisetzung mitochondrialer Zelltodsignale. Ursprünglich wurden die Folgen dieser altersbedingten Schädigungen der Mitochondrien nur in Einschränkungen der Atmungskettenkapazität gesehen. Heute werden auch andere Veränderungen von Mitochondrienfunktionen, wie zusätzlich erhöhte mitochondriale Radikalbildung und gesteigerte Anfälligkeit für mitochondrial ausgelösten Zelltod, als Folge dieser mitochondrialen Genomdefekte diskutiert. In den letzten Jahren waren deshalb ROS und ihre Rolle bei pathologischen Veränderungen wie Mutationen, Karzinogenese, Inflammation und anderen verschiedenen Erkrankungen das Objekt zahlreicher Studien (Kohen *et al.*, 2002). Sie wurden mit dem Zelltod und Myokardinfarkt, der Entwicklung ventrikulärer Hypertrophie und Herzversagen in Verbindung gebracht (Sorescu *et al.*, 2002). Da oxidativer Stress weiterhin zu DNA-Schäden und Mutationen von Tumorsuppressorgenen führen kann, wurde die Rolle der ROS in der Karzinogenese untersucht (Epe, 2002; Kang, 2002; Benhar *et al.*, 2002).

Ein häufig beschriebenes Kennzeichen von Geweben mit postmitotischen Zellen alter Tiere ist eine extreme Variabilität von Größe und Form der Mitochondrien, mit extrem großen Riesenmitochondrien, die ultrastrukturelle Zeichen von Entartung aufweisen (Brunk *et al.*, 2002). Diese Heterogenität ist ein Resultat gestörter Teilungen von oxidativ geschädigten Mitochondrien und verminderter lysosomaler Autophagie dieser vergrößerten Mitochondrien (zentraler Mechanismus der „Mitochondrial-Lysosomal Axis“ Theorie des Alterns). Während diese persistierenden geschädigten Riesenmitochondrien ihre Funktion verlieren, kommt es zu einer kompensatorischen Neubildung kleiner Mitochondrien (Brunk *et al.*, 2002). Die verzögerte und gestörte lysosomale Autophagie von vergrößerten Mitochondrien erleichtert die Anreicherung von Lipofuscineinschlüssen in den Lysosomen, welche Überreste der degenerierten Riesenmitochondrien enthalten. Dies kann zu einer weiteren Störung der lysosomalen Funktion und veränderter zellulärer Anfälligkeit für Apoptose führen (Brunk *et al.*, 2002; Terman *et al.*, 1999).

Eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen in Geweben mit postmitotischen Zellen wird subtilen Verschiebungen des Redox-Gleichgewichtes durch mitochondriale Radikalbildung während des aeroben Stoffwechsels zugesprochen. Besonders betroffen von derartiger mitochondrialer Radikalbildung ist die mitochondriale DNA aufgrund ihrer Nähe zur radikalbildenden Atmungskette und wegen ihrer begrenzten DNA-Reparaturkapazität. So werden altersassoziiert vermehrt mitochondriale DNA-Schäden in Herz, Gehirn und Muskulatur gefunden, deren funktionelle Wertigkeit jedoch noch strittig ist. Ein Hauptproblem dabei ist, dass der Schwellenwert für die funktionelle Relevanz von mitochondrialen DNA-Schäden wegen der Heteroplasmie der mitochondrialen DNA noch ungeklärt ist, d.h. Heteroplasmiegrade der mitochondrialen DNA, bei denen Defizite funktionell nachweisbar sind. Der Nachweis mitochondrialer Defekte wird weiterhin durch den variablen Mitochondriengehalt der Zellen erschwert, wodurch eine Normalisierung funktioneller und enzymatischer Daten im untersuchten Gewebe erforderlich ist. Um die Pathophysiologie mitochondrialer Erkrankungen besser zu verstehen, ist deshalb eine genaue Kenntnis der Zusammenhänge zwischen Mutation, Heteroplasmie und Funktion erforderlich.

In einem vielzelligen Organismus ist es von essentieller Bedeutung, dass Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel der einzelnen Zellen in ihren Geweben und Organen aufeinander abgestimmt sind. Hierzu bedarf es eines Kommunikationssystems, das zum Teil auch über eine größere Entfernung im Körper wirksam ist. Die Zell-Zell-Interaktion wird in solch einem Fall über Signalmoleküle sichergestellt, die von bestimmten Zellen produziert und sezerniert werden und auf andere Zellen über spezifische, hochaffine Zelloberflä-



chenrezeptoren wirken. Eines dieser Signalsysteme wird durch die Proteinfamilie der Neureguline und ihrer Rezeptoren repräsentiert (Marchionni, 1995). Diese große Gruppe membranständiger oder sezernierter Peptide fördern Wachstum und Differenzierung während der Entwicklung und Onkogenese (Burden *et al.*, 1997). Sie beeinflussen verschiedene Zelltypen und spielen eine elementare Rolle in der Entwicklung des Herzens und des Nervensystems (Carraway, 1996).

Die Neuregulin-Wachstumsfaktoren binden an den Mitgliedern einer Unterfamilie von Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität, den erbB-Rezeptoren. Zu dieser Familie gehören erbB1 und die ihm strukturell sehr ähnlichen Rezeptoren erbB2, erbB3 und erbB4 (Stern *et al.*, 1986; Kraus *et al.*, 1989; Plowman *et al.*, 1993). Im Myokard von Säugern sind erbB2 und erbB4 die Rezeptoren für Neureguline und sie steuern in Kulturen von Rattenkardiomyozyten Wachstum und Überleben (Zhao *et al.*, 1998; Baliga *et al.*, 1999). Das Neuregulin/erbB-System spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Herzens von Embryos. Postnataler konditioneller erbB2-Mangel führt in Kardiomyozyten zu schwerer Kardiomyopathie und erhöhter Anfälligkeit für Anthracyclin-induzierten Zelltod (Ozcelik *et al.*, 2002; Crone *et al.*, 2002).

Bemerkenswerterweise führt die adenovirale Gabe von Bcl-xL in die erbB2-defizienten Herzen zu funktionellen Verbesserungen (Crone *et al.*, 2002). Das Transkript des Bcl-x Gens wird in Säugern in die mRNAs für das antiapoptotische Protein Bcl-xL und das proapoptotische Bcl-xS gespleißt (Reed, 1999). Die Überexpression von Bcl-xS wirkt gegen den protektiven Effekt von Bcl-xL, indem es in den Mitochondrien über die Freisetzung von Cytochrom c eine Caspase-abhängige Apoptose auslöst (Minn *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 2003). Im Herzen stellt Bcl-xL das dominierende antiapoptotische Protein dar (Bartling *et al.*, 1999), wogegen Bcl-xS in krankem Myokard nach Infarkten stark induziert wird (Prabhu *et al.*, 2003). In linken Ventrikeln von insuffizientem humanem Myokard und in Muskelproben ist das proapoptotische Bcl-xS im Alter hochreguliert, unter kalorischer Restriktion ist Bcl-xS jedoch fast nicht nachweisbar. Ursache dafür ist eine Verschiebung des Gleichgewichts des Bcl-x-Spleißens von Bcl-xL zu Bcl-xS (Rohrbach *et al.*, 2005). Eine  $\beta$ -Blockade vermindert diese Verschiebung des Bcl-x-Spleißens, zeigt jedoch keine Wirkung auf die erbB-Rezeptoren. Im insuffizienten humanen Myokard sind die Neuregulinrezeptoren erbB2 und erbB4 herabreguliert und weniger aktiviert/phosphoryliert. In isolierten Kardiomyozyten bewirkt eine erbB-Rezeptor-Verminderung oder erbB-Rezeptor-Blockade die Verschiebung des Spleißens zu Bcl-xS. Das Spleißen von Bcl-x wird im Herz damit durch Neuregulin/erbB-Signale reguliert und, unabhängig davon, durch  $\beta$ -Blockade. Über diesen Weg stellt die Neu-

regulin/erbB-Signalkaskade einen Regulator der mitochondrialen Funktion dar (Rohrbach *et al.*, 2005).

Die mitochondriale Biogenese in eukaryotischen Zellen erfordert eine enge intergenomische Koordination zwischen dem mitochondrialen Genom, welches in Säugern nur für weniger als 10 % der Proteine der Atmungskette codiert, und dem nukleären Genom, in dem der weitaus überwiegende Teil aller mitochondrialen Proteine codiert ist. Das mitochondriale Genom in Säugern enthält nur noch Gene für 13 Proteinuntereinheiten, zwei mitochondriale rRNAs, einen Satz mitochondrialer tRNAs und nur einen einzigen nichtcodierenden Bereich. Bei dieser intergenomischen zellulären Koordination wird für die so genannte „retrograde Regulation“ von den Mitochondrien zum Kern oxidativer Stress durch mitochondriale Radikalbildung als Signal diskutiert (Maxwell *et al.*, 2002; Butow, 2002). Dagegen kann zytosolischer oxidativer Stress auch als Signal zur Steigerung der mitochondrialen Transkription und Replikation wirken (Lee *et al.*, 2000; Mittler, 2002). Andererseits ist oxidativer Stress ein wichtiges Signal zur Auslösung des mitochondrial vermittelten Zelltods (Chandra *et al.*, 2000) und gilt als Faktor für mitochondriale Genomschädigungen und Progression von degenerativen Erkrankungen (Wallace, 1992) und von Alterung (Sastre *et al.*, 2000; Szibor *et al.*, 2003).

Die Regulation dieser gegensätzlichen Reaktionen auf ein graduierbares Signal (Davies, 1999) stellt ein zentrales Problem der mitochondrialen Endosymbiose in Eukaryoten dar und ist keineswegs vollständig verstanden. Arbeiten im Institut für Pathophysiologie in immortalisierten Säugerzellen haben gezeigt, dass oxidativer Stress in einem Ausmaß, welcher zu mitochondrialen Genomverlusten von über 80 % führen kann, von diesen Zellen überlebt wird, wobei eine Regeneration des mtDNA-Gehaltes durch gesteigerte Replikation innerhalb weniger Tage nach der Stress-Exposition eintritt (Noack *et al.*, unveröffentlicht). Diese erstaunliche regenerative mtDNA-Replikationsfähigkeit nach oxidativem Stress stellt einen für die zelluläre Überlebens- und Anpassungsfähigkeit kritischen Schutzmechanismus von fundamentaler Bedeutung dar. Von dieser postoxidativen, regenerativen mtDNA-Replikation ist nicht bekannt, wie sie reguliert wird und inwieweit sie in Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad oder mit unterschiedlichem Ausmaß des Transfers mitochondrialer Genomanteile in den Kern während der Evolution der Eukaryoten (Race *et al.*, 1999) erhalten ist.

Alle Hypothesen des mitochondrialen Alterns gehen von einer langsamen und kontinuierlichen Ansammlung oxidativer Schäden der Mitochondrien und ihrer DNA als einem frühen Schritt in der postulierten Abfolge der Pathomechanismen aus. Viele Untersuchungen von oxidativen Schäden mitochondrialer DNA in gealterten Geweben zeigen Verbindungen zwi-

schen steigendem Alter und Zunahme der Anzeichen mitochondrialer DNA-Schäden (Ozawa, 1997; Wallace, 1992). So wurden in systematischer Vorgehensweise hunderte von PCR Primerpaaren über das gesamte mitochondriale Genom verteilt und in einer gemeinsamen Reaktion zur Analyse von humanem Myokard verwendet. Bei der Untersuchung der Proben von Unfallopfern ohne vorherige kardiale Auffälligkeiten wurde erstaunlicherweise eine hohe Anzahl unvollständiger DNA-Moleküle entdeckt. Jedoch können diese und ähnliche Analysen kritisiert werden. Unvollständige Duplikationen der mitochondrialen DNA (Bodyak *et al.*, 2001) können nicht von richtigen Deletionen unterschieden werden; verkürzte mitochondriale DNA kann durch unvollständige Degradation entstehen und diese kann in einem PCR-Protokoll, welches verschiedene Primerpaare gleichzeitig enthält, bevorzugt amplifiziert werden. Wichtiger jedoch ist, dass mit diesen Analysen nicht der Grad der Heteroplasmie innerhalb eines einzelnen Mitochondriums ermittelt werden kann, ab dem der Phänotyp beeinflusst wird. Solche Analysen sind eindrucksvoll, schließen aber nicht aus, dass ein biologisch irrelevantes Epiphänomen analysiert wird. In der hier vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund mit methodisch unterschiedlichen Herangehensweisen mitochondriale Parameter (Genexpression, Enzymaktivitäten, mtDNA-Analysen) untersucht und in Zusammenhang gebracht.

## 5.5 Schlussfolgerung

Sowohl bei tierexperimentellen Untersuchungen an alten Ratten, als auch bei Untersuchungen von krankem humanem Myokard zeigte sich ein signifikantes Defizit der Aktivität von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Dieses Defizit resultiert entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit nicht aus Schäden der mitochondrialen DNA oder einer gestörten mitochondrialen Genexpression.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität von Komplex I der Atmungskette, welcher mitochondrial codierte Untereinheiten enthält sowohl im Alter als auch bei Erkrankungen des Herzens erniedrigt ist. Auf den ersten Blick scheint dieses Resultat mit einer Fehlfunktion der Expression der mitochondrialen DNA einherzugehen, wie sie in einem Mausmodell nach Myokardinfarkt gezeigt wurde (Ide *et al.*, 2001). Keine dieser Änderungen konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit auf molekularbiologischer Ebene (*mtDNA-copy-number*, Transkription) im Tiermodell des Alterns und bei der Untersuchung von insuffizienten humanen Herzen bestätigt werden. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass nur die

extrem starke Schädigung des Myokards, wie sie im Infarktmodell an Mäusen gezeigt wurde, derartige Änderungen verursachen kann. Derartige Werte werden weder in alten Tieren noch in insuffizientem humanem Myokard erreicht. Zum anderen müssen die von Ide *et al.* gezeigten Expressionsdaten nicht die primären Veränderungen der mitochondrialen Parameter im Alter widerspiegeln.

Die Änderungen auf funktioneller Ebene (Enzymaktivität, Mikrorespirometrie) gehen mit den von Ide (Ide *et al.*, 2001) gezeigten Daten einher. Die Depression von Komplex I ist somit kein ausschließlich genotypischer Effekt und wird auch nicht nur durch verringerte mitochondriale Genexpression verursacht. Die altersabhängigen Veränderungen der Mitochondrien im linken Ventrikel und im M. soleus beruhen auf einer allgemeinen Abnahme der Mitochondrienzahl (vgl. 3.2.2 und 4.2) sowie auf einer signifikanten Erniedrigung der Aktivität von Komplex I.

Sowohl bei der Mikrorespirometrie permeabilisierter Fasern als auch bei der komplexspezifischen Enzymaktivitätsbestimmung ist in beiden Organen die altersassoziierte Depression des Komplexes I ausgeprägter als die des Komplexes II.

Daran ist bedeutsam, dass in den Komplexen I, III und IV mitochondrial codierte Proteinuntereinheiten enthalten sind, im Gegensatz zum Komplex II, der nur kerncodierte Untereinheiten enthält. Der größte und dadurch wahrscheinlich auch stör anfälligste Enzymkomplex der Atmungskette ist Komplex I. Von seinen 43 Untereinheiten werden sieben mitochondrial codiert (Wallace, 1999). Schädigungen der Mitochondrien sollten dadurch am ehesten in seiner Aktivität erkennbar sein.

Die globale Erniedrigung der Aktivität von Komplex I stellt einen neuen primären pathophysiologischen Mechanismus im Alter dar. Diese mitochondriale Dysfunktion ist sowohl im Myokard als auch im Skelettmuskel unabhängig von Störungen der mtDNA-Struktur sowie der Genexpression zu finden. Sie ist im Alter unter kalorischer Restriktion reversibel, während die gleiche kalorische Restriktion in jungen Tieren keinerlei mitochondriale Auswirkungen zeigt. Sie findet sich weiterhin in allen untersuchten Rattenstämmen. Sie kommt ebenfalls im Menschen bei Herzinsuffizienz vor und hat, da dies einen Zustand vorzeitiger kardialer Alterung darstellt, eine medizinische Relevanz.

Die Erniedrigung der Aktivität von Komplex I geht mit einer Verschiebung des mitochondrialen Bcl-xL/xS Verhältnisses einher. Weiterführende Arbeiten deuten außerdem auf die grund-

legende Bedeutung der Neuregulin/erbB-Signalkaskade als Regulator dieser mitochondrialen Funktion hin (Rohrbach *et al.*, 2005). Eine anderweitige mögliche Ursache für eine Disproportionalität der Atmungskette kann in durch Punktmutationen veränderten mitochondrialen Proteinen der Atmungskette oder in Fehlern bei der Assemblierung der Komplexe der Atmungskette liegen. Altersassoziierte Akkumulationen solcher Deletionen und Mutationen der mitochondrialen DNA sind nachgewiesen (Fayet *et al.*, 2002) und können Auswirkungen auf die Synthese mitochondrial codierter Untereinheiten haben. Dahingehend finden im Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität weitergehende Untersuchungen des Proteoms statt, die darüber Aufschluss liefern sollen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Alterungsprozesse sind eng mit mitochondrialen Veränderungen verknüpft. Auch die Komplexe der Atmungskette sind mittelbar davon betroffen. Akkumulierende Schäden der mitochondrialen DNA im Altersmyokard sollen als Ursache für eine vermehrte Radikalbildung, respiratorische Funktionseinschränkungen und die Freisetzung mitochondrialer Zelltodsignale gelten.

In der vorliegenden Arbeit sollten Zusammenhänge zwischen funktionellen Parametern der Mitochondrien sowie der mitochondrialen und nukleären Transkription erfasst werden.

Für die Bestimmung der funktionellen Parameter wurden im Tiermodell (alte und junge Ratten) mikrorespirometrische Untersuchungen an permeabilisierten Muskelfasern zur Untersuchung der mitochondrialen Atmungskette durchgeführt. Um die Isolation von mitochondrialen Subpopulationen mit besonderen Eigenschaften zu vermeiden, wurden die funktionellen Analysen der Mitochondrien mit der *skinned fiber*-Technik durchgeführt, bzw. Homogenate von Geweben eingesetzt. Die spektralphotometrische Messung der mitochondrialen Enzymaktivitäten erfolgte sowohl im Tiermodell als auch in den Proben der insuffizienten humanen Herzen.

Weiterhin wurden in Tiermodellen und in Proben von erkranktem, insuffizientem humanem Myokard ausgewählte mitochondriale Gene (12S rRNA, 16S rRNA, COX1 sowie ND6) und kerncodierte Gene ( $F_0F_1$ -ATPase, mtTFA und MnSOD) molekularbiologisch mittels kompetitiver standardkalibrierter RT-PCR bzw. semiquantitativer RT-PCR untersucht und quantifiziert. Abschließend wurde die Qualität und Quantität der mitochondrialen DNA der insuffizienten humanen Proben mittels Southern Blot untersucht.

Die mikrorespirometrischen Messungen zur Auswirkung des Alterns auf die funktionellen Parameter von Mitochondrien im Tiermodell ergaben, dass sowohl in den Geweben des linken Ventrikel als auch des M. soleus die Maximalatmung (*State 3*) in den alten Tieren hochsignifikant erniedrigt war. Auch nach der Hemmung von Komplex I mit Hilfe von Rotenon war die Succinatatmung über Komplex II in beiden untersuchten Geweben in den alten Tieren hochsignifikant erniedrigt.

Die Berechnung des Quotienten für die *Succinat Related Pyruvat Respiration* ergab im linken Ventrikel und auch im M. soleus eine signifikante Verminderung in den Proben der alten

Tiere. Dementsprechend konnte bei der Bestimmung der *Pyruvat Related Succinat Respiration* ein Anstieg in den alten Tieren verzeichnet werden.

Mit Hilfe der spektralphotometrischen Messungen erfolgte die Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivitäten sowohl im Tiermodell als auch in den Proben der insuffizienten humanen Herzen. Die Aktivitäten der Komplexe I, I + III und III waren im Myokard und im M. soleus alter Ratten zum Teil signifikant erniedrigt. Die Citratsynthaseaktivität war in beiden Geweben signifikant verringert. Die daraus ermittelten Quotienten der SRNO und der KIII-RNO waren in den Ventrikeln signifikant und im M. soleus nicht signifikant erniedrigt. In den Proben humaner Ventrikel konnte eine hochsignifikante Verminderung von Komplex I und I + III sowie eine Verringerung der Aktivität von Komplex III festgestellt werden. Die entsprechenden Quotienten waren ebenfalls signifikant erniedrigt.

Die Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen der mitochondrialen und kerncodierten Gene ergab in den alten Tieren eine geringfügig verringerte Expression im Vergleich zu den jungen Tieren. Diese Änderungen waren jedoch nicht statistisch signifikant. Bei der Untersuchung der humanen Myokardproben konnte in den insuffizienten Proben eine leicht erhöhte Genexpression im Vergleich zu gesundem Myokard (Spenderherzen) festgestellt werden. Auch diese Änderungen waren statistisch nicht signifikant. Die Untersuchungen zur Genexpression konnten also weder im Tiermodell (jung vs. alt) noch im humanen Myokard (Spender vs. Insuffizient) signifikante Unterschiede in der Expression der untersuchten mitochondrialen und kerncodierten Gene aufzeigen.

Bei der Untersuchung der Qualität der mitochondrialen DNA von insuffizientem und Spendermyokard im Southern-Blot konnten keine Änderungen festgestellt werden, die auf eine Schädigung der mitochondrialen DNA schließen lassen.

Es wird geschlussfolgert, dass die altersabhängigen Änderungen der funktionellen Parameter der Mitochondrien in Herz- und Skelettmuskel nicht durch Schäden der mitochondrialen DNA, oder durch eine gestörte mitochondriale Genexpression verursacht werden. Da diese Änderungen unter kalorischer Restriktion reversibel sind, ist vielmehr davon auszugehen, dass sie einen primären pathophysiologisch relevanten Mechanismus im Alter darstellen. Eine entscheidende Rolle kann dabei die Neuregulin/erbB-Signalkaskade als Regulator der mitochondrialen Funktion spielen. Weiterhin können diese Änderungen durch mittels Punktmutationen veränderte mitochondriale Proteine oder eine fehlerhafte Assemblierung hervorgerufen werden, auf die dann eine Verringerung der Aktivität von Komplex I zurückzuführen ist.

## 7 LITERATUR

Allen JF. Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* 1993; **165**(4): 609-31.

Aspnæs LE, Lee CM, Weindruch R, Chung SS, Roecker EB, Aiken JM. Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. *Faseb J* 1997; **11**(7): 573-81.

Bai Y, Attardi G. The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *Embo J* 1998; **17**(16): 4848-58.

Baliga RR, Pimental DR, Zhao YY, Simmons WW, Marchionni MA, Sawyer DB, Kelly RA. NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK. *Am J Physiol* 1999; **277**(5 Pt 2): H2026-37.

Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**(4): 347-66.

Barrientos A, Moraes CT. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem* 1999; **274**(23): 16188-97.

Bartling B, Milting H, Schumann H, Darmer D, Arusoglu L, Koerner MM, El-Banayosy A, Koerfer R, Holtz J, Zerkowski HR. Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 1999; **100**(19 Suppl): II216-23.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; **78**(2): 547-81.

Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **854**: 118-27.

Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 2002; **3**(5): 420-5.

Bernardi P, Broeckemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore: a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerget Biomembr* 1994; **26**: 509-517.

Birks EJ, Burton PB, Owen V, Mullen AJ, Hunt D, Banner NR, Barton PJ, Yacoub MH. Elevated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in myocardium and serum of malfunctioning donor hearts. *Circulation* 2000; **102**(19 Suppl 3): III352-8.

Blair SN, Shaten J, Brownell K, Collins G, Lissner L. Body weight change, all-cause mortality, and cause-specific mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Ann Intern*



Med 1993; **119**(7 Pt 2): 749-57.

Bodyak ND, Nekhaeva E, Wei JY, Khrapko K. Quantification and sequencing of somatic deleted mtDNA in single cells: evidence for partially duplicated mtDNA in aged human tissues. *Hum Mol Genet* 2001; **10**(1): 17-24.

Bogenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 1974; **249**(24): 7991-5.

Bohr VA, Anson RM. Mitochondrial DNA repair pathways. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**(4): 391-8.

Borutaite V, Morkuniene R, Budriunaite A, Krasauskaite D, Ryselis S, Toleikis A, Brown GC. Kinetic analysis of changes in activity of heart mitochondrial oxidative phosphorylation system induced by ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1996; **28**(10): 2195-201.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; **134**(3): 707-16.

Braun T, Dar S, Vorobiov D, Lindenboim L, Dascal N, Stein R. Expression of Bcl-x(S) in *Xenopus* oocytes induces BH3-dependent and caspase-dependent cytochrome c release and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2003; **1**(3): 186-94.

Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; **46**: 223-34.

Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism* 2000; **49**(2 Suppl 1): 9-13.

Brunk UT, Jones CB, Sohal RS. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat Res* 1992; **275**(3-6): 395-403.

Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**(5): 611-9.

Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 1996-2002.

Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997; **18**(6): 847-55.

Butow RA. Cellular responses to mitochondrial dysfunction: it's not always downhill. *Cell Death Differ* 2002; **9**(10): 1043-5.

Carraway KL, 3rd. Involvement of the neuregulins and their receptors in cardiac and neural development. *Bioessays* 1996; **18**(4): 263-6.

Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress.

Free Radic Biol Med 2000; **29**(3-4): 323-33.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid isolated from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; **18**: 5294-5299.

Chueh PJ, Kim C, Cho N, Morre DM, Morre DJ. Molecular cloning and characterization of a tumor-associated, growth-related, and time-keeping hydroquinone (NADH) oxidase (tNOX) of the HeLa cell surface. *Biochemistry* 2002; **41**(11): 3732-41.

Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 2000; **406**(6794): 415-8.

Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 1991; **7**: 453-78.

Clayton DA. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* 1992; **141**: 217-32.

Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(13): 7631-6.

Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* 2001; **28**: 147-150.

Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 1992; **2**(4): 324-9.

Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, Peterson KL, Chen J, Kahn R, Condorelli G, Ross J, Jr., Chien KR, Lee KF. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2002; **8**(5): 459-65.

Darnell JE, Lodish HF, Baltimore D. *Molecular Cell Biology*. 2nd edition, Scientific American Books, Inc. 1990; New York

Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 1999; **48**(1): 41-7.

de Grey AD. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *Bioessays* 1997; **19**(2): 161-6.

de Grey AD. The reductive hotspot hypothesis: an update. *Arch Biochem Biophys* 2000; **373**(1): 295-301.

de Souza-Pinto NC, Eide L, Hogue BA, Thybo T, Stevnsner T, Seeberg E, Klungland A, Bohr VA. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice. *Cancer Res* 2001; **61**(14): 5378-81.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; **10**(9): 369-77.

Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G, Leeuwenburgh C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **284**(2): R474-80.

Drexler H, Kastner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G. Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1998; **32**(4): 955-63.

Druzhyina N, Smulson ME, LeDoux SP, Wilson GL. Poly(ADP-ribose) polymerase facilitates the repair of N-methylpurines in mitochondrial DNA. *Diabetes* 2000; **49**(11): 1849-55.

Drygas W, Kostka T, Jegier A, Kunski H. Long-term effects of different physical activity levels on coronary heart disease risk factors in middle-aged men. *Int J Sports Med* 2000; **21**(4): 235-41.

Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure. *Circ Res* 1999; **84**(10): 1137-43.

Epe B. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 2002; **383**(3-4): 467-75.

Erlanson-Albertsson C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand* 2003; **178**(4): 405-12.

Fayet G, Jansson M, Sternberg D, Moslemi AR, Blondy P, Lombes A, Fardeau M, Oldfors A. Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. *Neuromuscul Disord* 2002; **12**(5): 484-93.

Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997; **15**(3): 269-72.

Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF. *Pathophysiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2000; Heidelberg

Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1998; **273**(40): 25734-25740.

Forfia PR, Hintze TH, Wolin MS, Kaley G. Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function. *Adv Exp Med Biol* 1999; **471**: 381-8.

Förster E. An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *Biotechniques* 1994; **16**(1): 18-20.

Garstka HL, Schmitt WE, Schultz J, Sogl B, Silakowski B, Perez-Martos A, Montoya J, Wiesner RJ. Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**(17): 5039-47.

Gellerich F, Skladal D, Schranzhofer R, Lanznaster N, Kunz W, Wisniewski E, Kuznetsov A, Krismer M, Gnaiger E, Margreiter, Sperl W (1995). Hochauflösende Respirometrie und multiple Substrat/Inhibitor-Titration zum funktionellen Nachweis mitochondrialer Defekte in permeabilisierten Muskelfasern. *Molekulare Grundlage hereditärer Myopathien*. G M and G U. München; Bern; Wien; New York, W. Zuckschwerdt Verlag: 52-66.

Gellerich FN, Hertel K, von Wersebe O, Hein W, Zierz S (1997). Bioenergetische Untersuchungen der Mitochondrien in Muskelbiopsien zur Detektion mitochondrialer Myopathien. *Jahrbuch der neuromuskulären Erkrankungen* 1996. T Grimm, F Hanefeld, HC Hopfet *al.* München, Arcis Verlag: 91-95.

Gellerich FN, Kapischke M, Kunz W, Neumann W, Kuznetsov A, Brdiczka D, Nicolay K. The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. *Mol Cell Biochem* 1994; **133-134**: 85-104.

Gellerich FN, Trumbeckaite S, Muller T, Deschauer M, Chen Y, Gizatullina Z, Zierz S. Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Biochem* 2004; **256-257**(1-2): 391-405.

Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996; **97**(6): 1422-8.

Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *Faseb J* 2001; **15**(9): 1589-91.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield K. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1366**: 79-94.

Haller T, Ortner M, Gnaiger E. A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Anal Biochem* 1994; **218**(2): 338-42.

Harding AE. Growing old: the most common mitochondrial disease of all? *Nat Genet* 1992; **2**(4): 251-2.

Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res* 2001; **89**(3): 198-200.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; **11**: 298-300.

Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972; **20**: 145-147.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; **25**: 585-621.

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

Heinecke H. *Angewandte Versuchstierkunde*. Urban & Fischer Verlag. 1989; Jena

Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001; **88**(5): 529-35.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999; **85**: 357-363.

Jager D, Muller-Werdan U, Ponicke K, Holtz J, Werdan K, Muller SP. The impact of insulin-like growth factor-1 on the pattern of cardiac elongation factor-2 variants in a model of overload. *Mol Cell Biochem* 2002; **229**(1-2): 25-34.

Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F, Casademont J. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2000; **45**(4): 860-5.

Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K, Murakoshi N, Goto K, Yamaguchi I. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* 2001; **103**(19): 2387-94.

Kang DH. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues* 2002; **13**(4): 540-9.

Kanki T, Nakayama H, Sasaki N, Takio K, Alam TI, Hamasaki N, Kang D. Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1011**: 61-8.

Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D. Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* 2004; **24**(22): 9823-34.

Kay L, Saks VA, Rossi A. Early alteration of the control of mitochondrial function in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**(12): 3399-411.

Kerr PM, Suleiman MS, Halestrap AP. Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. *Am J Physiol* 1999; **276**(2 Pt 2):

H496-502.

Khrapko K, Bodyak N, Thilly WG, van Orsouw NJ, Zhang X, Collier HA, Perls TT, Upton M, Vijg J, Wei JY. Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**(11): 2434-41.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; **30**(6): 620-50.

Köhler T, Laßner D, Rost A-K, Thamm B, Pustowoit R, Remke H. Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction: nonradioactive PCR methods. Springer-Verlag. 1995; Berlin

Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; **416**(1): 15-8.

Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(23): 9193-7.

Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; **6**(5): 513-9.

Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med* 1993; **15**(6): 621-7.

Kunz WS, Kuznetsov AV, Gellerich FN. Mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers is stimulated by caffeine. *FEBS Lett* 1993; **323**(1-2): 188-90.

Lakatta EG. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. *Heart Fail Rev* 2002; **7**(1): 29-49.

Lakatta EG, Boluyt MO (2000). Age-associated changes in the cardiovascular system in the absence of cardiovascular disease. *Congestive heart failure*. JD Hosenpud and BH Greenberg. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 137-156.

Lakshmipathy U, Campbell C. Antisense-mediated decrease in DNA ligase III expression results in reduced mitochondrial DNA integrity. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**(3): 668-76.

Larsson NG, Barsh GS, Clayton DA. Structure and chromosomal localization of the mouse mitochondrial transcription factor A gene (Tfam). *Mamm Genome* 1997; **8**(2): 139-40.

Larsson NG, Oldfors A, Garman JD, Barsh GS, Clayton DA. Down-regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. *Hum Mol Genet* 1997; **6**(2): 185-91.

Lecrenier N, Foury F. New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 2000; **246**(1-2): 37-48.

- Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 2000; **348 Pt 2**: 425-32.
- Lenaz G, Fato R, Genova ML, Formiggini G, Parenti Castelli G, Bovina C. Underevaluation of complex I activity by the direct assay of NADH-coenzyme Q reductase in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1995; **366(2-3)**: 119-21.
- Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr Res* 1992; **32(1)**: 17-22.
- Lewis W, Gonzalez B, Chomyn A, Papoian T. Zidovudine induces molecular, biochemical, and ultrastructural changes in rat skeletal muscle mitochondria. *J Clin Invest* 1992; **89(4)**: 1354-60.
- Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1997; **272(5 Pt 2)**: H2313-9.
- Lilienthal JL, Jr., Zierler KL, Folk BP, Buka R, Riley MJ, With the technical assistance of M. B. Glass and M. Jaffe. A reference base and system for analysis of muscle constituents. *J. Biol. Chem.* 1950; **182(2)**: 501-508.
- Lindholm A, Piehl K. Fibre composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of standardbred horses. *Acta Vet Scand* 1974; **15(3)**: 287-309.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989; **1(8639)**: 642-5.
- Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest* 1995; **73(6)**: 771-87.
- Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag. 1998; Berlin, Heidelberg, New York, Mailand, Paris, Singapur, Tokio
- Luo X, Pitkanen S, Kassovska-Bratinova S, Robinson BH, Lehotay DC. Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency. *J Clin Invest* 1997; **99(12)**: 2877-82.
- Marchionni MA. Cell-cell signalling. neu tack on neuregulin. *Nature* 1995; **378(6555)**: 334-5.
- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW. Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res* 2001; **52(1)**: 103-10.
- Maxwell DP, Nickels R, McIntosh L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J* 2002; **29(3)**: 269-79.
- Melov S, Coskun PE, Wallace DC. Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress, and senescence. *Mutat Res* 1999; **434**: 233-242.

- Menzies RA, Gold PH. The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J Biol Chem* 1971; **246**(8): 2425-9.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999; **286**(5440): 774-9.
- Minn AJ, Boise LH, Thompson CB. Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J Biol Chem* 1996; **271**(11): 6306-12.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2002; **7**(9): 405-10.
- Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**(3): 214-20.
- Moore GB, Himms-Hagen J, Harper ME, Clapham JC. Overexpression of UCP-3 in skeletal muscle of mice results in increased expression of mitochondrial thioesterase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **283**(4): 785-90.
- Moraes CT. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet* 2001; **17**(4): 199-205.
- Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andretta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S. mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 1991; **48**(3): 492-501.
- Morawietz H, Szibor M, Goettsch W, Bartling B, Barton M, Shaw S, Koerfer R, Zerkowski HR, Holtz J. Unloading of the left ventricle by ventricular assist device normalizes increased expression of endothelin ET(A) receptors but not endothelin-converting enzyme-1 in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 2000; **102**(19 Suppl 3): III188-93.
- Morre DJ, Sedlak D, Tang X, Chueh PJ, Geng T, Morre DM. Surface NADH oxidase of HeLa cells lacks intrinsic membrane binding motifs. *Arch Biochem Biophys* 2001; **392**(2): 251-6.
- Müller S, Brömme H, Rothe M, Foth H, Holtz J. Gewebsgehalt von Coenzym Q10 in alternierenden Ratten nach subcutaner Applikation einer Q10 Nanodispersion. *N-S ARCH PHARMACOL* 2001; **4**: 363.
- Müller SP, Krivokuca M, Werdan K, Darmer D, Foth H, Holtz J. Age-specific right ventricular decompensation in response to pulmonary hypertension in senescent rats. *Toxicol Letters* 2000; **116**: 78.
- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; **335**(16): 1182-9.
- Nekhaeva E, Bodyak ND, Kraytsberg Y, McGrath SB, Van Orsouw NJ, Pluzhnikov A, Wei JY, Vijg J, Khrapko K. Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual



cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(8): 5521-5526.

Nekhaeva E, Kraytsberg Y, Khrapko K. mtLOH (mitochondrial loss of heteroplasmy), aging, and 'surrogate self'. *Mech Ageing Dev* 2002; **123**(8): 891-8.

Neubauer S, Remkes H, Spindler M, Horn M, Wiesmann F, Prestle J, Walzel B, Ertl G, Hasenfuss G, Wallimann T. Downregulation of the Na(+)-creatine cotransporter in failing human myocardium and in experimental heart failure. *Circulation* 1999; **100**(18): 1847-50.

Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 1984; **64**(1): 1-64.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; **404**(6779): 787-90.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; **336**(16): 1131-41.

Otterlei M, Haug T, Nagelhus TA, Slupphaug G, Lindmo T, Krokan HE. Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**(20): 4611-7.

Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* 1997; **77**(2): 425-64.

Ozcelik C, Erdmann B, Pilz B, Wettschureck N, Britsch S, Hubner N, Chien KR, Birchmeier C, Garratt AN. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(13): 8880-5.

Paffenbarger RS, Jr., Kampert JB, Lee IM, Hyde RT, Leung RW, Wing AL. Changes in physical activity and other lifeway patterns influencing longevity. *Med Sci Sports Exerc* 1994; **26**(7): 857-65.

Pamplona R, Portero-Otin M, Bellmun MJ, Gredilla R, Barja G. Aging increases Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases Nepsilon-(carboxyethyl)lysine and Nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Radic Res* 2002; **36**(1): 47-54.

Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997; **174**: 305-319.

Pastorino JG, Simbula G, Gilfor E, Hoek JB, Farber JL. Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31041-31046.

Pearl R. The rate of living. Alfred Knopf Publishing. 1928; New York

Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol [B]* 1998; **168**: 149-158.

Pitkanen S, Robinson BH. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1996; **98**(2): 345-51.

Plenz G, Eschert H, Erren M, Wichter T, Bohm M, Flesch M, Scheld HH, Deng MC. The interleukin-6/interleukin-6-receptor system is activated in donor hearts. *J Am Coll Cardiol* 2002; **39**(9): 1508-12.

Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**(5): 1746-50.

Porta E. Advances in age pigment research. *Arch Gerontol Geriatr* 1991; **12**: 303-20.

Prabhu SD, Wang G, Luo J, Gu Y, Ping P, Chandrasekar B. Beta-adrenergic receptor blockade modulates Bcl-X(S) expression and reduces apoptosis in failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35**(5): 483-93.

Pushkarsky T, Rourke L, Spiegel LA, Seldin MF, Bucala R. Molecular characterization of a mouse genomic element mobilized by advanced glycation endproduct modified-DNA (AGE-DNA). *Mol Med* 1997; **3**(11): 740-9.

Race HL, Herrmann RG, Martin W. Why have organelles retained genomes? *Trends Genet* 1999; **15**: 364-370.

Recchia FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res* 1998; **83**(10): 969-79.

Reed JC. Splicing and dicing apoptosis genes. *Nat Biotechnol* 1999; **17**(11): 1064-5.

Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 2000; **529 Pt 1**: 3-10.

Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* 1988; **136**(3): 507-13.

Rohrbach S, Muller-Werdan U, Werdan K, Koch S, Gellerich NF, Holtz J. Apoptosis-modulating interaction of the neuregulin/erbB pathway with antracyclines in regulating Bcl-xS and Bcl-xL in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **38**(3): 485-93.

Rohrbach S, Niemann B, Silber RE, Holtz J. Neuregulin receptors erbB2 and erbB4 in failing human myocardium Depressed expression and attenuated activation. *Basic Res Cardiol* 2005.

Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulicier AM, Bouillaud F, Ricquier D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 2004; **53 Suppl 1**: S130-5.

Rubner M. Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zum Wachstum und Ernährung. Oldenbourg Verlag. 1908; München

Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging- reality or myth-ochondria? *Mech Ageing Dev* 2000; **114**(3): 201-6.

Saavedra WF, Paolocci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, Harrison RW, Zeichner J, Mudrick D, Marban E, Kass DA, Hare JM. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res* 2002; **90**(3): 297-304.

Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann F, Kunz WS. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* 1998; **184**(1-2): 81-100.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989; New York

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; **74**(12): 5463-7.

Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999; **29**(5): 380-6.

Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 1999; **283**(5407): 1488-93.

Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* 2000; **49**: 427-435.

Scheubel RJ, Bartling B, Stein S, Darmer D, Holtz J, Pregla R, Hetzer R, Koerfer R, Zerkowski HR, Silber RE. Age-dependent myocardial reinduction of apoptosis inhibitors under VAD in heart failure. *Thorac Cardiovasc Surg* 2001; **49**(5): 268-72.

Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE, Holtz J. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* 2002; **40**(12): 2174-81.

Schwerzmann K, Hoppeler H, Kayar SR, Weibel ER. Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(5): 1583-7.

Sesso HD, Paffenbarger RS, Jr., Lee IM. Physical activity and coronary heart disease in men: The Harvard Alumni Health Study. *Circulation* 2000; **102**(9): 975-80.

- Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 409-35.
- Shapira Y, Harel S, Russell A. Mitochondrial encephalomyopathies: a group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. *Isr J Med Sci* 1977; **13**(2): 161-4.
- Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996; **148**(1): 141-9.
- Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000; **32**(12): 2361-7.
- Sheldrake R. The Ageing, Growth and Death of Cells. *Nature* 1974; **250**(5465): 381-385.
- Shepherd JA, Garland PB. Citrate synthase from rat liver. *Meth. Enzymol.* 1969; **13**: 11-19.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(23): 10771-8.
- Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 1996; **29**(2): 169-202.
- Smeitink JA, Sengers RC, Trijbels FJ, van den Heuvel LP. Nuclear genes and oxidative phosphorylation disorders: a review. *Eur J Pediatr* 2000; **159 Suppl 3**: S227-31.
- Sohal RS. Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. *Mech Ageing Dev* 1991; **60**(2): 189-98.
- Sohal RS, Marzabadi MR, Galaris D, Brunk UT. Effect of ambient oxygen concentration on lipofuscin accumulation in cultured rat heart myocytes--a novel in vitro model of lipofuscino-genesis. *Free Radic Biol Med* 1989; **6**(1): 23-30.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; **273**(5271): 59-63.
- Sordahl LA, Stewart ML. Mechanism(s) of altered mitochondrial calcium transport in acutely ischemic canine hearts. *Circ Res* 1980; **47**(6): 814-20.
- Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail* 2002; **8**(3): 132-40.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**(3): 503-17.
- Sperl W, Skladal D, Gnaiger E, Wyss M, Mayr U, Hager J, Gellerich FN. High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Mol Cell Biochem* 1997; **174**(1-2): 71-8.
- Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a re-

- ceptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol* 1986; **6**(5): 1729-40.
- Stryer L. *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag. 1996; Berlin
- Svatkova R, Cervinkova Z, Kalous M, Rauchova H, Drahota Z. Respiratory control index of mitochondria isolated from regenerating rat liver. *Physiol Res* 1996; **45**(3): 249-52.
- Szibor M, Holtz J. Mitochondrial ageing. *Basic Res Cardiol* 2003; **98**(4): 210-8.
- Takamatsu C, Umeda S, Ohsato T, Ohno T, Abe Y, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N, Kang D. Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep* 2002; **3**(5): 451-6.
- Taylor RW, Taylor GA, Durham SE, Turnbull DM. The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**(15): E74-4.
- Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; **97**(12): 2891-7.
- Terman A. Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? *Redox Rep* 2001; **6**(1): 15-26.
- Terman A, Brunk UT. On the degradability and exocytosis of ceroid/lipofuscin in cultured rat cardiac myocytes. *Mech Ageing Dev* 1998; **100**(2): 145-56.
- Terman A, Dalen H, Brunk UT. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during amino acid starvation. *Exp Gerontol* 1999; **34**(8): 943-57.
- Toleikis A, Krasauskaite D, Trumbeckaite S, Dagys A. Assessment of mitochondrial respiration and effect of ischemia in saponin-skinned cardiac fibers. *Biologija* 1996; **4**: 43-49.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004; **429**(6990): 417-23.
- Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 1996; **264**: 484-509.
- Trumbeckaite S, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN. Calpain inhibitor (BSF 409425) diminishes ischemia/reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2003; **65**(5): 911-6.
- Trumbeckaite S, Opalka JR, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN. Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. *Eur J Biochem* 2001; **268**(5): 1422-9.

Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, Kang D, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation* 2001; **104**(24): 2883-5.

Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997; **17**(1): 3-8.

Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 1987; **892**(2): 191-6.

Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992; **256**(5057): 628-32.

Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; **283**(5407): 1482-8.

Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, Miller CA, Askanas V, Engel WK, Bhasin S, Attardi G. Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(7): 4022-7.

Warburg O, Christian W. Pyridin, the hydrogen-transferring component of the fermentation enzymes (pyridine nucleotide). *Biochem. Z.* 1936; **287**: 291.

Weindruch R, Sohal RS. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med* 1997; **337**(14): 986-94.

Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988; **175**(1): 231-7.

Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 1989; **58**(5): 923-31.

Yan SD, Stern D, Schmidt AM. What's the RAGE? The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the dark side of glucose. *Eur J Clin Invest* 1997; **27**(3): 179-81.

Ye Y, Gong G, Ochiai K, Liu J, Zhang J. High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model. *Circulation* 2001; **103**(11): 1570-6.

Yuhki KI, Miyauchi T, Kakinuma Y, Murakoshi N, Maeda S, Goto K, Yamaguchi I, Suzuki T. Endothelin-1 production is enhanced by rotenone, a mitochondrial complex I inhibitor, in cultured rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; **38**(6): 850-8.

Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, Opel DJ, Han X, Marchionni MA, Kelly RA. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1998; **273**(17): 10261-9.

## ANHANG

*Respirometriedaten Myokard Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten*

Tier	Alter	Behandlung	P/M+ADP	Rotenon	Succinat	Atractylat	Antimycin A	Leak
C05	24 Monate	Q10	126,750	20,550	73,500	31,200	15,500	15,700
C06	24 Monate	Q10	106,500	22,200	103,000	40,567	16,050	29,600
C07	24 Monate	Q10	96,000	13,857	83,000	26,833	20,200	22,000
C08	24 Monate	Q10	169,000	18,333	128,000	39,667	10,467	29,200
C09	24 Monate	Q10	107,000	21,433	86,000	32,367	12,300	25,700
C10	24 Monate	Q10	175,500	20,100	114,000	37,100	14,533	22,567
C12	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	129,800	14,900	177,000	52,900	14,900	38,000
C13	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	185,667	17,200	128,333	42,033	19,167	22,867
C14	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	141,000	16,200	128,000	39,367	13,867	25,500
C15	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	187,400	14,600	144,500	45,750	13,450	32,300
C16	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	159,167	22,633	118,300	43,667	20,433	23,233
C17	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	310,233	9,437	222,833	66,593	20,370	46,223
C18	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	332,000	8,105	218,467	66,493	16,717	49,777
C19	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	336,667	12,337	214,667	68,273	17,953	50,320
C20	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	308,267	7,003	209,667	65,370	17,067	48,303
C21	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	340,067	11,203	223,483	68,547	18,923	49,623
C22	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	266,900	8,230	163,883	54,820	15,333	39,487

**Tabelle 7-1: Zusammenfassung der Messergebnisse der mikrorespirometrischen Untersuchungen linker Ventrikel von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Erläuterungen zu den Abkürzungen der Messwerte unter 4.1. Alle Werte sind in pmol O<sub>2</sub>/s/mg angegeben. Keine Messung bei C01, C02, C03, C04, C11 mangels Probenmaterials.

*Enzymaktivitäten Myokard Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten*

Tier	Alter	Art der Behandlung	KI	KI + III	KII + III	KIII	COX	CS	NCP
C01	24 Monate	Q10	12,51	3,63	7,43	38,73	24,53	96,33	166,0
C02	24 Monate	Q10	12,28	5,53	7,05	41,11	26,29	101,66	138,7
C03	24 Monate	Q10	5,35	3,45	5,38	49,19	36,47	57,99	159,4
C04	24 Monate	Q10	7,12	9,58	8,89	51,96	29,01	77,01	133,1
C05	24 Monate	Q10	7,97	6,85	15,23	88,21	34,64	80,11	158,0
C06	24 Monate	Q10	8,29	18,50	16,00	94,65	62,20	102,64	159,0
C07	24 Monate	Q10	7,96	5,28	8,97	49,89	29,39	93,89	127,4
C08	24 Monate	Q10	9,05	9,01	11,75	65,40	44,67	93,65	144,9
C09	24 Monate	Q10	7,84	7,67	12,63	70,79	46,92	98,87	145,9
C10	24 Monate	Q10	4,97	4,19	8,53	49,26	33,65	86,51	130,1
C11	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	8,61	15,34	15,32	75,43	52,73	100,88	151,6
C12	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	6,15	11,25	10,11	72,38	40,01	77,14	135,0
C13	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	8,56	11,08	10,54	62,65	47,28	88,01	152,5
C14	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,41	9,20	14,78	78,07	31,52	93,56	128,3
C15	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	6,63	13,29	14,49	73,10	24,76	94,49	143,5
C16	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	10,12	13,83	15,59	71,44	56,99	106,86	162,4
C17	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	7,26	13,24	14,37	76,26	61,26	121,72	163,6
C18	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	10,93	23,97	14,60	87,22	55,33	125,34	157,7
C19	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	13,19	15,36	10,96	58,10	20,74	94,44	156,2
C20	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,02	10,75	13,25	63,41	43,25	85,71	141,6
C21	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	15,07	12,28	11,45	46,71	26,23	108,94	170,8
C22	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	14,35	13,52	15,97	78,29	38,46	119,86	153,1

**Enzymaktivitäten *M. soleus* Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten**

Tier	Alter	Art der Behandlung	KI	KI + III	KII + III	KIII	COX	CS	NCP
C05	24 Monate	Q10	1,11	1,61	2,28	24,35	14,93	20,04	109,20
C06	24 Monate	Q10	2,31	1,72	2,59	29,91	14,46	20,53	107,70
C07	24 Monate	Q10	2,18	1,75	2,09	23,76	8,29	16,56	73,06
C08	24 Monate	Q10	2,07	1,54	3,54	27,59	17,54	21,52	87,54
C09	24 Monate	Q10	2,51	2,16	3,77	36,43	15,08	21,33	103,90
C10	24 Monate	Q10	1,57	2,01	2,62	28,77	12,68	18,71	91,33
C11	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,80	2,53	1,53	23,15	13,63	17,24	140,50
C12	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,87	2,29	4,25	28,95	19,78	21,63	100,70
C13	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,73	2,22	3,21	23,87	17,54	20,21	100,70
C14	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	2,75	1,62	4,61	35,60	21,68	23,21	107,70
C15	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	2,13	1,52	2,57	28,89	21,80	18,07	92,40
C16	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,99	2,33	3,85	34,81	15,76	20,83	78,90
C17	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	2,53	3,13	2,39	34,30	7,35	22,25	89,80
C18	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	4,04	4,31	3,61	38,10	22,16	26,46	105,00
C19	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	3,54	3,00	4,01	36,56	24,53	25,70	102,80
C20	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	2,01	4,23	4,08	45,78	22,28	29,32	77,63
C21	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	3,92	3,09	4,09	35,10	23,22	26,21	95,80
C22	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	3,86	2,29	5,08	41,10	28,32	30,14	91,17

**Tabelle 7-2: Zusammenstellung der Daten der Enzymaktivitäten der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette im Myokard und *M. soleus* von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Alle Werte sind in U/g ww sowie NCP in mg/ml angegeben. Keine Messung im *M. soleus* bei C01, C02, C03, C04 mangels Probenmaterial.

**Enzymaktivitäten humaner linker Ventrikel**

Patient	Erkrankung	KI	KI + III	KII + III	KIII	COX	CS	NCP
UKK01	DCM	3,94	2,60	4,63	33,48	8,65	36,98	77,31
UKK04	DCM	2,16	4,44	6,57	37,40	11,68	48,49	91,41
UKK08	DCM	4,12	1,30	4,40	17,71	14,47	46,30	81,81
UKK19	DCM	4,62	4,48	10,74	54,53	20,61	40,79	84,36
UKK22	DCM	6,67	8,47	11,48	61,17	24,28	47,02	102,70
UKK27	DCM	3,12	4,49	4,72	28,18	15,52	27,56	61,17
UKK30	DCM	4,54	1,56	7,88	40,12	16,76	40,69	69,70
UKK32	DCM	4,99	3,26	9,87	38,23	13,98	38,04	78,60
UKK33	DCM	3,33	2,25	6,51	30,38	7,70	46,84	83,44
UKK35	DCM	5,74	4,27	9,56	36,87	19,84	58,27	78,60
UKK36	DCM	5,35	4,27	8,44	39,95	22,45	42,74	66,24
UKK38	DCM	4,04	3,22	7,03	29,94	10,87	41,73	62,42
UKK39	DCM	4,24	7,39	9,23	48,86	24,84	44,15	73,57
UKK40	DCM	2,67	2,47	5,09	27,92	9,33	24,53	60,97
UKK41	DCM	5,74	5,90	10,12	44,26	23,11	37,32	72,62
UKK44	DCM	3,99	6,08	8,43	42,28	15,81	36,58	82,15
UKK45	DCM	7,52	8,60	10,92	59,28	22,99	50,52	113,20
UKK49	DCM	3,69	4,64	8,31	37,41	14,58	41,14	16,30
UKK51	DCM	3,57	4,27	4,98	28,71	9,72	39,59	21,51
UKK53	DCM	7,04	7,23	12,31	49,72	32,77	46,42	21,98
UKK55	DCM	4,57	5,42	7,14	35,75	11,61	39,09	89,53
UKK57	DCM	4,70	5,04	6,67	43,46	20,35	33,05	46,80
UKK58	DCM	3,24	2,59	7,89	42,58	8,13	23,71	25,90
UKK02	ICM	1,58	0,87	1,37	21,17	5,45	18,34	76,70
UKK03	ICM	3,79	2,31	2,20	19,04	7,41	29,04	64,09
UKK07	ICM	4,82	2,58	4,69	22,68	7,14	37,56	68,46
UKK09	ICM	4,60	2,76	5,74	23,30	9,93	45,80	88,48
UKK10	ICM	2,65	2,97	6,55	20,33	7,88	30,48	17,10
UKK14	ICM	2,32	2,94	7,63	23,55	13,39	26,88	67,48
UKK15	ICM	7,38	5,69	7,63	40,81	29,81	39,79	90,77
UKK16	ICM	4,77	5,85	11,04	55,87	17,92	46,41	82,95
UKK25	ICM	4,33	5,64	6,79	49,77	21,17	39,09	71,08



## Anhang

Patient	Erkrankung	KI	KI + III	KII + III	KIII	COX	CS	NCP
UKK28	ICM	6,15	4,25	8,07	41,99	34,36	50,33	90,44
UKK29	ICM	7,19	10,66	15,66	73,53	32,44	62,91	87,80
UKK31	ICM	2,77	0,97	1,58	17,16	5,24	17,80	56,69
UKK34	ICM	7,82	3,09	6,42	32,39	21,16	49,63	89,78
UKK42	ICM	6,79	6,96	12,39	53,81	22,18	55,85	93,57
UKK50	ICM	3,26	3,88	8,38	48,64	23,58	36,45	18,00
UKK54	ICM	3,76	6,71	8,75	41,49	15,22	39,59	53,90
UKK56	ICM	3,99	4,67	9,65	36,91	15,73	39,96	21,80
UKK59	ICM	8,60	7,04	15,03	58,69	18,94	53,75	41,20
UKK60	ICM	5,96	7,04	11,01	41,77	12,73	44,04	17,70
B24	ICM	2,21	1,06	2,36	21,94	5,91	28,40	45,40
P01	Spender	5,81	4,82	7,90	45,98	18,60	48,24	62,69
P02	Spender	6,57	7,66	9,43	45,27	23,05	50,48	26,06
P03	Spender	4,96	4,55	6,09	32,52	12,37	40,41	40,49
P04	Spender	5,21	5,05	7,22	35,47	21,55	41,72	66,23
Sp1	Spender	8,82	9,56	7,63	47,29	20,04	39,24	82,61
Sp2	Spender	8,66	6,02	9,54	55,05	27,77	43,96	85,13
Sp3	Spender	8,33	7,77	9,55	47,65	26,56	43,76	40,46
Sp4	Spender	9,44	6,39	7,55	37,34	24,94	49,01	91,72
Sp5	Spender	6,43	4,35	10,42	51,01	16,86	50,19	95,63
Sp6	Spender	4,86	4,12	6,42	37,24	14,42	37,50	57,63

**Tabelle 7-3: Zusammenfassung der Daten der Enzymaktivitäten der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette in linken Ventrikeln humaner Proben:** Alle Werte sind in U/g ww sowie NCP in mg/ml angegeben.

### Genexpression Sprague-Dawley-Ratten

Tier		12S rRNA	COX1	ND6	ATPase
Ratte 21	alt	1,39E+05	1,22E+04	3,91E+02	2,35E+01
Ratte 22	alt	2,08E+05	2,46E+04	7,77E+02	4,89E+01
Ratte 25	alt	1,63E+05	7,90E+03	3,53E+02	2,63E+01
Ratte 28	alt	1,68E+05	1,88E+04	4,51E+02	5,08E+01
Ratte 29	alt	2,00E+05	2,25E+04	6,27E+02	6,40E+01
Ratte 30	alt	1,51E+05	1,16E+04	3,77E+02	4,31E+01
Ratte 31	alt	1,33E+05	1,45E+04	4,15E+02	5,38E+01
Ratte 32	alt	9,38E+04	1,05E+04	5,35E+02	4,81E+01
Ratte 23	jung	2,40E+05	2,88E+04	6,40E+02	5,68E+01
Ratte 24	jung	2,03E+05	1,29E+04	5,25E+02	5,27E+01
Ratte 26	jung	2,03E+05	2,30E+04	5,93E+02	5,70E+01
Ratte 27	jung	1,65E+05	1,33E+04	3,18E+02	4,26E+01
Ratte 33	jung	1,24E+05	9,75E+03	1,97E+02	3,89E+01

**Tabelle 7-4: Messergebnisse der kompetitiven standardkalibrierten RT-PCR linker Ventrikel von Sprague-Dawley-Ratten:** Alle Werte sind in amol/ $\mu$ g Gesamt-RNA angegeben.

### Genexpression Fisher-L-NAME-Ratten

Tier	Alter	Behandlung	linke Ventrikel					rechte Ventrikel				
			12S rRNA	COX1	ND6	ATPase	mt-TFA	12S rRNA	COX1	ND6	ATPase	mt-TFA
B 15	jung	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,18E+04	9,93E+03	8,73E+02	6,87E+01	0,95	9,20E+04	7,27E+03	8,13E+02	5,01E+01	0,62
B 16	jung	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,67E+04	8,59E+03	7,53E+02	3,17E+01	1,51	9,22E+04	1,07E+04	1,14E+03	8,51E+01	0,98
B 17	jung	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	8,94E+04	5,89E+03	9,24E+02	4,37E+01	0,74	1,32E+05	7,58E+03	1,18E+03	5,88E+01	0,65
B 28	jung	2d L-NAME	6,65E+04	6,28E+03	5,09E+02	3,82E+01	0,46	9,75E+04	7,26E+03	6,83E+02	6,27E+01	0,75
B 29	jung	2d L-NAME	7,67E+04	7,20E+03	3,32E+02	3,81E+01	0,60	1,08E+05	7,61E+03	1,04E+03	1,10E+02	0,71
B 30	jung	2d L-NAME	8,54E+04	6,01E+03	5,27E+02	7,00E+01	1,14	6,05E+04	6,88E+03	7,24E+02	6,58E+01	0,68
B 31	jung	2d L-NAME	5,35E+04	5,30E+03	4,98E+02	3,68E+01	0,32	9,23E+04	5,95E+03	5,06E+02	5,09E+01	1,04
B 32	jung	2d L-NAME	6,63E+04	4,18E+03	5,15E+02	3,16E+01	0,41	5,91E+04	3,87E+03	3,88E+02	2,53E+01	0,27
B 38	jung	4d L-NAME	7,79E+04	8,26E+03	1,03E+03	5,27E+01	0,90	5,69E+04	1,83E+03	4,26E+02	6,10E+01	0,48

## Anhang

Tier	Alter	Behandlung	linke Ventrikel					rechte Ventrikel				
			12S rRNA	COX1	ND6	ATPase	mt-TFA	12S rRNA	COX1	ND6	ATPase	mt-TFA
B 39	jung	4d L-NAME	7,91E+04	8,39E+03	8,78E+02	5,87E+01	0,76	3,88E+04	5,09E+03	1,00E+02	2,70E+01	0,19
B 40	jung	4d L-NAME	9,40E+04	7,02E+03	8,78E+02	5,86E+01	0,83	9,52E+04	9,52E+03	2,60E+02	7,35E+01	0,46
B 41	jung	4d L-NAME	1,07E+05	5,96E+03	5,97E+02	5,15E+01	0,66	5,59E+04	7,35E+03	1,25E+02	5,85E+01	0,59
B 42	jung	4d L-NAME	8,02E+04	4,18E+03	9,07E+02	3,43E+01	0,66	6,46E+04	5,30E+03	7,96E+02	5,13E+01	0,81
B 58	19/21 Mon.	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	7,49E+04	9,92E+03	1,10E+03	4,30E+01	0,73	6,08E+04	1,03E+04	3,91E+02	4,95E+01	0,76
B 59	19/21 Mon.	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	7,05E+04	6,03E+03	7,60E+02	2,78E+01	0,51	8,31E+04	5,31E+03	4,59E+02	2,12E+01	0,52
B 60	19/21 Mon.	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,45E+04	5,42E+03	8,14E+02	3,88E+01	0,63	5,87E+04	5,09E+03	3,53E+02	2,85E+01	0,45
B 61	19/21 Mon.	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	8,15E+04	7,35E+03	9,37E+02	3,15E+01	0,46	5,75E+04	7,68E+03	6,68E+02	4,21E+01	0,58
B 62	19/21 Mon.	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	4,26E+04	6,13E+03	1,00E+03	4,60E+01	0,73	4,35E+04	6,65E+03	4,94E+02	3,54E+01	0,73
B 33	19/21 Mon.	2d L-NAME	5,55E+04	6,37E+03	3,71E+02	4,03E+01	1,18	9,34E+04	1,02E+04	9,00E+02	6,63E+01	0,66
B 34	19/21 Mon.	2d L-NAME	5,70E+04	5,90E+03	3,59E+02	2,79E+01	0,81	6,07E+04	6,06E+03	7,07E+02	4,17E+01	0,57
B 35	19/21 Mon.	2d L-NAME	5,24E+04	5,04E+03	4,49E+02	2,42E+01	0,87	6,38E+04	5,73E+03	8,61E+02	4,53E+01	0,59
B 36	19/21 Mon.	2d L-NAME	8,91E+04	6,51E+03	3,39E+02	3,40E+01	0,90	8,14E+04	5,70E+03	1,23E+02	2,93E+01	0,17
B 37	19/21 Mon.	2d L-NAME	4,66E+04	5,12E+03	6,08E+02	2,56E+01	0,83	5,59E+04	5,47E+03	1,09E+02	1,89E+01	0,44
B 43	19/21 Mon.	4d L-NAME	5,06E+04	4,22E+03	8,37E+02	4,31E+01	0,46	1,75E+04	4,94E+03	1,82E+02	3,40E+01	0,35
B 44	19/21 Mon.	4d L-NAME	8,56E+04	6,85E+03	5,52E+02	4,23E+01	0,59	8,22E+04	7,25E+03	6,52E+02	8,26E+01	0,55
B 45	19/21 Mon.	4d L-NAME	1,08E+05	8,45E+03	1,11E+03	5,40E+01	0,64	7,27E+04	5,56E+03	5,42E+02	4,51E+01	0,55
B 46	19/21 Mon.	4d L-NAME	1,01E+05	6,61E+03	1,01E+03	4,20E+01	0,68	8,27E+04	7,81E+03	2,02E+02	5,63E+01	0,80
B 47	19/21 Mon.	4d L-NAME	3,43E+04	5,11E+03	8,67E+02	4,22E+01	0,48	6,37E+04	6,81E+03	7,51E+02	7,36E+01	0,83
B 06	24 Mon.	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	3,86E+04	3,85E+03	5,96E+02	3,51E+01	0,44	5,97E+04	7,29E+03	8,58E+02	8,35E+01	0,85
B 07	24 Mon.	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	6,37E+04	6,89E+03	7,15E+02	3,51E+01	0,62	8,29E+04	1,03E+04	7,48E+02	8,88E+01	0,43

**Tabelle 7-5: Messergebnisse der Untersuchungen der Genexpression an Fisher-L-NAME-Ratten:** Die Werte für 12S rRNA, COX1, ND6 und ATPase sind in amol/μg Gesamt-RNA angegeben, die Werte für mtTFA als relative Einheiten.

### Genexpression Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten

Tier	Alter	Behandlung	12S rRNA	COX1	ND6	ATPase	mtTFA
C01	24 Monate	Q10	1,06E+05	3,26E+03	3,01E+02	2,84E+01	0,23
C02	24 Monate	Q10	1,02E+05	4,81E+03	4,90E+02	7,08E+01	0,45
C03	24 Monate	Q10	9,79E+04	4,39E+03	3,16E+02	5,28E+01	0,33
C04	24 Monate	Q10	1,14E+05	5,31E+03	5,43E+02	6,63E+01	0,55
C05	24 Monate	Q10	7,76E+04	9,06E+03	6,72E+02	7,39E+01	0,37
C06	24 Monate	Q10	8,55E+04	6,46E+03	3,63E+02	5,03E+01	0,18
C07	24 Monate	Q10	6,38E+04	3,66E+03	2,69E+02	3,01E+01	0,25
C08	24 Monate	Q10	1,15E+05	6,52E+03	6,23E+02	8,49E+01	0,46
C09	24 Monate	Q10	6,84E+04	7,57E+03	5,31E+02	4,03E+01	0,35
C10	24 Monate	Q10	1,00E+05	3,01E+03	2,26E+02	2,74E+01	0,26
C11	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	6,17E+04	4,67E+03	2,72E+02	3,53E+01	0,21
C12	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,80E+04	7,05E+03	3,97E+02	5,14E+01	0,33
C13	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,04E+05	6,13E+03	5,18E+02	7,16E+01	0,29
C14	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,18E+05	6,20E+03	5,67E+02	7,38E+01	0,36
C15	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,09E+05	6,66E+03	9,26E+02	1,12E+02	0,44
C16	24 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,30E+05	9,30E+03	9,37E+02	8,91E+01	0,53
C17	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,40E+05	6,56E+03	6,82E+02	1,10E+02	0,46
C18	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,42E+05	5,94E+03	5,08E+02	5,25E+01	0,26
C19	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	7,06E+04	3,26E+03	2,85E+02	5,59E+01	0,31
C20	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,06E+04	6,11E+03	5,36E+02	7,66E+01	0,45
C21	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	1,39E+05	6,08E+03	7,04E+02	7,29E+01	0,47
C22	4 Monate	H <sub>2</sub> O-Kontrolle	9,05E+04	5,14E+03	2,91E+02	5,95E+01	0,33

**Tabelle 7-6: Messergebnisse der Untersuchungen der Genexpression in linken Ventrikeln von Fisher-Q<sub>10</sub>-Ratten:** Die Werte für 12S rRNA, COX1, ND6 und ATPase sind in amol/μg Gesamt-RNA angegeben, die Werte für mtTFA als relative Einheiten.

**Genexpression humane Proben**

Patient	Erkrankung	16S rRNA	ND6	COX1	MnSOD
UKK01	DCM	1,612	1,475	1,389	0,777
UKK04	DCM	1,555	1,486	1,363	0,664
UKK08	DCM	1,294	1,210	1,532	0,619
UKK19	DCM	1,746	1,478	1,738	0,546
UKK22	DCM	1,796	1,692	1,566	0,574
UKK27	DCM	1,597	1,016	1,380	0,703
UKK30	DCM	1,439	1,914	1,314	0,376
UKK32	DCM	2,358	1,408	2,013	0,981
UKK33	DCM	1,995	1,521	1,620	0,865
UKK35	DCM	1,736	1,668	1,425	0,530
UKK36	DCM	2,207	1,497	2,009	0,927
UKK38	DCM	1,817	0,802	1,464	0,754
UKK39	DCM	1,619	1,401	1,443	0,690
UKK40	DCM	3,020	1,216	2,348	1,079
UKK41	DCM	2,072	1,044	1,832	0,652
UKK44	DCM	0,895	0,931	1,000	0,422
UKK45	DCM	1,540	0,766	1,146	0,622
UKK49	DCM	1,635	1,476	1,566	0,518
UKK51	DCM	1,597	1,266	1,412	0,550
UKK53	DCM	1,944	1,165	1,745	0,809
UKK55	DCM	1,481	1,181	1,155	0,472
UKK57	DCM	1,424	0,867	1,100	0,427
UKK58	DCM	1,077	0,574	0,861	0,505
UKK02	ICM	1,640	1,722	1,482	0,775
UKK03	ICM	1,371	1,513	1,108	0,580
UKK07	ICM	1,653	1,558	1,488	0,693
UKK09	ICM	1,614	2,074	1,423	0,578
UKK10	ICM	1,153	0,593	0,727	0,386
UKK14	ICM	1,286	1,916	1,386	0,492
UKK15	ICM	1,336	1,338	1,430	0,505
UKK16	ICM	1,472	1,420	1,507	0,683
UKK25	ICM	2,034	1,442	1,693	0,674
UKK28	ICM	1,589	1,571	1,477	0,738
UKK29	ICM	1,837	1,537	1,389	0,719
UKK31	ICM	1,377	1,105	1,026	0,626
UKK34	ICM	1,738	1,446	1,479	0,553
UKK42	ICM	1,598	1,121	1,246	0,441
UKK50	ICM	1,614	1,386	1,353	0,644
UKK54	ICM	1,654	1,207	1,386	0,702
UKK56	ICM	1,981	1,288	1,592	0,648
UKK59	ICM	1,657	1,226	1,379	0,720
UKK60	ICM	1,966	1,075	1,778	0,879
P01	Spender	1,610	0,829	1,449	0,591
P02	Spender	1,358	1,214	1,251	0,572
P03	Spender	1,218	1,365	1,094	0,581
P04	Spender	1,673	1,185	1,514	0,575
Sp1	Spender	1,795	1,539	1,465	0,622
Sp2	Spender	2,297	1,783	2,133	0,955
Sp3	Spender	2,008	1,177	1,603	0,830
Sp4	Spender	1,548	0,853	1,229	0,454
Sp5	Spender	1,644	1,234	1,418	0,739
Sp6	Spender	1,098	0,757	1,273	0,465

**Tabelle 7-7: Zusammenstellung der Ergebnisse der semiquantitativen Untersuchungen der Genexpression in humanen linken Ventrikeln: Alle Werte sind als relative Einheiten angegeben.**

**Southern Blot humane linke Ventrikel**

Patient	mt DNA	18S rRNA	mt DNA/18S rRNA
UKK2	1161,30	72,99	15,91
UKK4	2991,17	371,84	8,04
UKK19	3061,17	385,66	7,94
UKK22	4308,11	565,74	7,61
UKK27	3130,21	402,39	7,78
UKK29	3636,16	443,43	8,20
UKK30	3680,33	294,21	12,51
UKK36	3809,85	304,40	12,52
UKK38	4185,53	512,90	8,16
UKK40	3451,74	424,65	8,13
UKK41	4627,46	725,46	6,38
UKK49	3889,99	1022,16	3,81
P01	4579,42	824,27	5,56
P02	5049,90	1083,67	4,66
Sp2	4727,15	642,81	7,35
Sp4	4484,45	485,10	9,24
Sp5	4755,45	829,72	5,73
Sp6	4639,54	666,25	6,96

**Tabelle 7-8: Darstellung der Messergebnisse der Southern Blot Analysen in linken Ventrikeln humaner Proben:** Die Werte für mtDNA und 18S rRNA sind als relative Einheiten der densitometrischen Auswertung angegeben, mtDNA/18S rRNA stellt die Ratio dar.

**Humane Proben Failure**

Patient	HTx date	sex	age	height	weight	Failure	NYHA	EF (%)	PCW	MAP	CI	ACE-I / AT1-Blocker	β-Blocker
UKK01	14.07.1995	m	57	175	75	DCM	IV	15	17	83	2,14	+	+
UKK04	05.02.1996	m	31	178	72	DCM	IV	22	8	80	2,1	+	-
UKK08	17.03.1996	m	63	168	82	DCM	III	17	5	93	2,3	+	-
UKK19	16.10.1996	m	49	175	86	DCM	III-IV	15	23	80	1,4	+	+
UKK22	05.12.1996	m	49	186	86	DCM	II-III	30	6	88	2,75	+	+
UKK27	04.02.1997	m	43	163	59	DCM	III	20	33	90	2,09	+	-
UKK30	11.03.1997	m	50	178	68	DCM	IV	20	26	83	1,74	+	-
UKK32	18.03.1997	m	45	172	64	DCM	III-IV	36	33	88	2,54	+	+
UKK33	16.04.1997	m	38	172	89	DCM	III	11	21	76	1,8	+	-
UKK35	13.05.1997	w	53	170	69	DCM	III	30	30	74	2,1	+	+
UKK36	17.05.1997	m	49	174	63	DCM	III-IV	32	22	65	1,53	+	-
UKK38	28.05.1997	m	63	176	80	DCM	III-IV	34	29	72	2,33	+	-
UKK39	21.06.1997	w	43	154	54	DCM	III-IV	27	27	80	1,4	-	+
UKK40	05.08.1997	m	54	185	70	DCM	III-IV	20	34			-	+
UKK41	11.08.1997	m	63	180	75	DCM	III	24	36	85	2,9	+	+
UKK44	03.11.1997	m	51	173	93	DCM	III	17	32	106	2,6	+	+
UKK45	02.12.1997	m	41	183	95	DCM	III	11	7	80	1,6	+	+
UKK49	31.03.1998	m	44	172	78	DCM	III-IV	25	14	70	2,18	+	+
UKK51	15.06.1999	m	44	189	97	DCM	III-IV	20	6	101	2,6	+	+
UKK53	21.10.1999	m	63	185	86	DCM	III	26	28	70	2,1	+	-
UKK55	07.03.2000	m	45	180	75	DCM	IV	10	25	65	3,13	-	+
UKK57	14.04.2000	m	57	175	95	DCM	IV	25	22	91	1,84	+	+
UKK58	01.07.2000	m	33	170	93	DCM	IV	14	33	80	2,2	+	+
UKK02	14.11.1995	m	64	170	75	ICM	IV	27	17	80	2,6	+	-
UKK03	27.11.1995	m	57	164	63	ICM	IV	19	24	76	2	+	-
UKK07	06.03.1996	m	54	176	73	ICM	IV	20	17	75	3,6	+	-
UKK09	17.03.1996	m	63	174	71	ICM	III-IV	37	11	80	2,22	+	+
UKK10	26.03.1996	m	57	167	65	ICM	III	36	9	87	3,01	+	-
UKK14	17.05.1996	m	57	178	78	ICM	IV	21	39	99	1,79	+	-
UKK15	21.06.1996	m	47	174	81	ICM	II-III	24	8	64	4,3	+	-
UKK16	01.08.1996	m	48	178	78	ICM	IV	6	20	109	1,7	+	-
UKK25	09.01.1997	m	58	180	87	ICM	IV	30	24	77	0,9	+	+
UKK28	05.02.1997	m	50	172	80	ICM	IV	35	24	79	1,54	+	+
UKK29	11.02.1997	m	54	178	95	ICM	IV	25	19	70	2,2	+	-

Patient	HTx date	sex	age	height	weight	Failure	NYHA	EF (%)	PCW	MAP	CI	ACE-I / AT1-Blocker	β-Blocker
UKK31	17.03.1997	w	58	164	64	ICM	III	24	13	88	1,2	+	+
UKK34	18.04.1997	w	44	175	97	ICM	III-IV	45	16	82	1,69	-	+
UKK42	10.09.1997	m	57	172	70	ICM	IV	36	8	90	4,07	+	-
UKK50	20.05.1998	m	56	178	86	ICM	III	33	16	83	3	+	+
UKK54	19.02.2000	m	64	174	96	ICM	III-IV	20	15	87	2,47	-	+
UKK56	30.03.2000	m	50	172	84	ICM	IV	23	16	78	2,5	-	-
UKK59	16.08.2000	m	59	183	81	ICM	IV	20	21	75	2,6	+	+
UKK60	25.08.2000	m	64	167	79	ICM	IV	30	12	120		+	+
B24	19.03.1992	m	53			ICM	III	39				+	+

**Tabelle 7-9: Übersicht über die verwendeten humanen Proben und deren klinische Charakterisierung:** NYHA: klinische Einteilung des Schweregrades der Herzinsuffizienz<sup>1</sup>; EF: ejection fraction; PCW: pulmonary capillary wedge; MAP: mean arterial pressure (arterieller Mitteldruck); CI: cardiac index; AT1-Blocker: Angiotensin-II Typ-1-Rezeptorblocker; ACE-I: ACE-Inhibitor; β-Blocker: Betarezeptorenblocker

<sup>1</sup> NYHA: New York Heart Association: Die New York Heart Association ist als nationale Institution gegründet worden, um die Häufigkeit und Folgen kardiovaskulärer Ereignisse zu minimieren. Durch sie erfolgte die Einteilung der Schweregrade der Herzinsuffizienz:

- I      Beschwerdefreiheit, normale körperliche Belastbarkeit
- II     Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastung
- III    Beschwerden schon bei leichter körperlicher Belastung
- IV    Beschwerden in Ruhe

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich auf dem Weg zur Erstellung dieser Dissertation begleitet und positiv beeinflusst haben.

Als erstes möchte ich dem Direktor des Instituts für Pathophysiologie, Prof. J. Holtz, meinen Dank für die Vergabe dieses interessanten Themas und sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeiten aussprechen.

Weiterhin danke ich ganz besonders Frau Dr. D. Darmer für die Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten, für ihre konstruktiven Vorschläge und Anregungen, die zum Fortschreiten der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Allen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Pathophysiologie danke ich für die entspannte, freundliche Atmosphäre im Labor, durch die ich mich bei meinen Arbeiten im Institut immer sehr wohl gefühlt habe. Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau B. Heinze, Frau R. Gall und Frau S. Kahrstedt danke ich für die freundliche Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor.

Ich danke dem Leiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie Prof. S. Zierz für die enge Zusammenarbeit. PD Dr. F. N. Gellerich danke ich für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung der enzymologischen Experimente. Frau Dr. Y. Chen danke ich für die enge Zusammenarbeit bei der Ausführung der Mikrorespirometrie.

Ganz besonders möchte ich den Mitarbeitern der Herz- und Thoraxchirurgie des Klinikums Kröllwitz unter der Leitung von Prof. R. E. Silber für die Zusammenarbeit danken.

Aus dem Institut für Umwelttoxikologie unter der Leitung von Frau Prof. H. Foth danke ich Frau Dr. S. P. Müller und Frau H. Grygier für die Haltung und Präparation der Versuchstiere.

Ich danke Dr. S. Bauer und meinen Kollegen aus dem Prodekanat Forschung für die mir gewährten Freiräume zur Fertigstellung der Arbeit.

Dr. R. Scheubel und R. Busath gilt mein ganz persönlicher Dank für die enge und gute Zusammenarbeit.

Geduld, Verständnis, Hilfe und Interesse durch meine Familie und meine Freunde haben ebenfalls wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Danke Heike, Danke Vera!

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

A handwritten signature in blue ink that reads "Mike Tostlebe". The signature is written in a cursive style.

Mike Tostlebe

Halle (Saale), den 14. April 2005

## **ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE**

Ich erkläre hiermit, dass ich nur diesen Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

A handwritten signature in blue ink that reads "Mike Tostlebe". The signature is written in a cursive style.

Mike Tostlebe

Halle (Saale), den 14. April 2005



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Mike Tostlebe  
geboren am 26.05.1971 in Finsterwalde  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind  
Nationalität: deutsch

---

## Ausbildung

09/77 - 08/87 Grundschule Finsterwalde  
09/87 - 08/89 Gymnasium Finsterwalde  
Juli 1989 Abitur  
  
10/90 - 10/95 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Lehramt an Gymnasien (Biologie/Chemie)  
Juni 1995 Erstes Staatsexamen  
  
11/95 - 11/97 Landesschulamt Berlin  
Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Gymnasien  
November 1997 Zweites Staatsexamen

---

## Berufserfahrung

11/97 - 07/99 Lehrkraft im Schuldienst des Landes Brandenburg  
Gesamtschule mit gym. Oberstufe „Bruno H. Bürgel“ Rathenow  
  
08/99 - 06/01 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pa-  
thophysiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg  
  
seit 07/01 Forschungsreferent im Prodekanat Forschung der Medi-  
zinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

---

## Wehrdienst

11/89 - 10/90 in Brandenburg/Havel

---



Mike Tostlebe

Halle (Saale), den 14. April 2005

## **Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:**

### **Journalbeitrag**

- 1 Scheubel RJ, *Tostlebe M*, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE, Holtz J (2002) Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. J AM COLL CARDIOL, 40(12): 2174-81.
- 2 Scheubel RJ, *Tostlebe M*, Darmer D, Gellerich FN, Silber RE, Holtz J (2002) Dysfunktion des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes I im menschlichen terminal insuffizienten Myokard beruht nicht auf gestörter mitochondrialer Genexpression. Z KARDIOL, 91: 50
- 3 *Tostlebe M*, Chen Y, Müller SP, Opalka J, Zierz S, Holtz J, Gellerich FN (2002) Alters-induzierte Verminderung der mitochondrialen Atmungs-Kapazität in Herz und Skelettmuskulatur von Ratten sind überwiegend durch Komplex I bedingt. Z KARDIOL, 91: 289

### **Buchbeitrag**

- 1 Holtz J, *Tostlebe M*, Darmer D (2000) Mechanisms and relevance of apoptosis. In: Hasenfuß G, Marban E (Hg.) Molecular Approaches to Heart Failure Therapy. Springer/Steinkopff Verlag, Darmstadt, 197-231