

---

# Wirkung von Kreatin auf Neurodegeneration und Alterung

Tobias Haack

---



München 2008

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig–Maximilians–Universität München

Direktorin: Frau Prof. Dr. M. Dieterich

---

**Wirkung von Kreatin  
auf Neurodegeneration und Alterung**

---

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

vorgelegt von  
Tobias Haack  
aus Überlingen

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Klopstock
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Hans A. Kretschmar Prof. Dr. Winfried Lange
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Andreas Bender
Dekan:	Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>9</b>
1.1	Der Alterungsprozess . . . . .	9
1.1.1	Begriffsbestimmung . . . . .	9
1.1.2	Definition des Alterungsprozesses . . . . .	9
1.2	Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen . . . . .	11
1.2.1	Altern aus Sicht der Evolutionstheorie . . . . .	12
1.2.2	Mechanistische Theorien über das Altern: Überblick . . . . .	17
1.2.3	Stochastische Theorien . . . . .	17
1.2.4	Entwicklungsgenetische Theorien . . . . .	20
1.3	Lebenserwartung und maximale Lebensdauer . . . . .	23
1.3.1	Lebenserwartung . . . . .	24
1.3.2	Maximale Lebensdauer . . . . .	24
1.3.3	Die “Gesunde Lebensdauer“ . . . . .	25
1.4	Möglichkeiten der Lebensverlängerung . . . . .	25
1.4.1	Erniedrigung der Temperatur . . . . .	25
1.4.2	Verminderung der Aktivität . . . . .	25
1.4.3	Kalorienreduktion ohne Mangelernährung . . . . .	25
1.4.4	Antioxidantien . . . . .	26
1.4.5	Genetische Manipulationen . . . . .	27
1.5	Strukturen mit besonderer Relevanz für den Alterungsprozess . . . . .	28
1.5.1	Der Hippocampus . . . . .	28
1.5.2	Das Mitochondrium . . . . .	29
1.6	Lipofuszin . . . . .	34
1.7	Die Prüfsubstanz Kreatin . . . . .	35
1.7.1	Synthese und Abbau von Kreatin . . . . .	37
1.7.2	Wirkmechanismen von Kreatin . . . . .	37
1.7.3	Therapeutischer Gebrauch . . . . .	41
1.7.4	Negative Auswirkungen von Kreatin . . . . .	44
1.7.5	Zusammenfassung . . . . .	44
1.8	Die “CreaLife“-Studie . . . . .	45
1.8.1	Methoden . . . . .	45
1.8.2	Ergebnisse . . . . .	46
<b>2</b>	<b>Eigene Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>50</b>
3.1	Tiere und Tierhaltung . . . . .	50

## *Inhaltsverzeichnis*

3.1.1	Tiere und Gruppeneinteilung . . . . .	50
3.1.2	Tierhaltung . . . . .	50
3.1.3	Ernährung und Kreatin-Diät . . . . .	51
3.1.4	Tötungskriterien und standardisierte Tötung . . . . .	51
3.1.5	Organentnahme und Konservierung . . . . .	51
3.2	Quantifizierung von Lipofuszin . . . . .	52
3.2.1	Material . . . . .	52
3.2.2	Methoden . . . . .	52
3.3	Quantifizierung COX-negativer Zellen . . . . .	58
3.3.1	Material . . . . .	58
3.3.2	Methoden . . . . .	60
3.4	Quantifizierung von mtDNA-Deletionen in Hirn- und Muskelhomogenat mit real time-PCR . . . . .	63
3.4.1	Material . . . . .	63
3.4.2	Methoden . . . . .	64
3.5	Quantifizierung von mtDNA-Deletionen der CA2-Region mittels real time-PCR . . . . .	68
3.5.1	Material . . . . .	68
3.5.2	Methoden . . . . .	69
3.6	Darstellung von Deletionen der mtDNA von Hirn- und Muskelgewebe mittels long range-PCR . . . . .	72
3.6.1	Material . . . . .	72
3.6.2	Methoden . . . . .	74
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>77</b>
4.1	Lipofuszingehalt der CA1- und CA2-Region des Hippocampus . . . . .	77
4.2	COX-negative Zellen in der COX/SDH-Färbung . . . . .	81
4.3	real time-PCR mit DNA von Pyramidenzellen der CA2-Region, Muskel- und Hirnhomogenat . . . . .	82
4.4	long range-PCR mit DNA aus Hirn- und Muskelhomogenat . . . . .	86
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
5.1	Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik . . . . .	88
5.1.1	Lipofuszin . . . . .	88
5.1.2	COX-defiziente Zellen . . . . .	90
5.1.3	Deletionen der mtDNA . . . . .	92
5.1.4	Relevanz des Tiermodells . . . . .	95
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>

*Inhaltsverzeichnis*

<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>119</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Übersicht Alterungstheorien . . . . .	12
1.2	Lebenserwartung . . . . .	24
1.3	Der Hippocampus . . . . .	30
1.4	Entstehung von Lipofuszin . . . . .	36
1.5	Regeneration von ATP durch Kreatinphosphat. . . . .	38
1.6	Kaplan-Meier Überlebenskurve . . . . .	46
1.7	Gedächtnis, Verhalten und Aktivität unter Kreatingabe . . . . .	47
3.1	Screenshot der zur Bildanalyse verwendeten Software . . . . .	57
3.2	Ablauf der Lasermikrodissektion . . . . .	71
3.3	Hippocampus vor und nach Lasermikrodissektion . . . . .	71
4.1	Ergebnisse der Quantifizierung von Lipofuszin in der CA1-Region: Balkendiagramm . . . . .	78
4.2	Digitalaufnahme der Autofluoreszenz von Lipofuszin in der CA2-Region: Kreatin-behandeltes versus Kontrolltier . . . . .	79
4.3	Ergebnisse der Quantifizierung von Lipofuszin in der CA2-Region: Balkendiagramm . . . . .	80
4.4	Digitalaufnahme einer COX-negativen Zelle der Positivkontrolle . . . . .	81
4.5	Digitalaufnahme eines Hirnschnittes nach COX/SDH-Färbung . . . . .	82
4.6	Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Muskelhomogenat als Balkendiagramm . . . . .	83
4.7	Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Hirnhomogenat als Balkendiagramm . . . . .	84
4.8	Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA von Pyramidenzellen der CA2-Region als Balkendiagramm . . . . .	86
4.9	Ergebnis der long range-PCR . . . . .	87

## Tabellenverzeichnis

3.1	Gruppeneinteilung der CreaLife Studie . . . . .	50
3.2	Alter der Tiere bei Versuchsbeginn und Tötung . . . . .	52
3.3	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien für die Quantifizierung von Lipofuszin . . . . .	53
3.4	Geräte und deren Software für die Quantifizierung von Lipofuszin . . . . .	53
3.5	Protokoll zum Entparaffinieren: Arbeitsschritte und Durchführung . . . . .	54
3.6	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien COX/SDH-Färbung . . . . .	59
3.7	Protokoll für die kombinierte COX/SDH-Färbung . . . . .	62
3.8	Verbrauchsmaterialien für die real time-PCR . . . . .	63
3.9	Geräte mit Software für die real time-PCR . . . . .	63
3.10	Sequenzen von Primern und Probes der real time-PCR . . . . .	66
3.11	Protokoll real time-PCR für ein Reaktionsvolumen von 20 $\mu$ l . . . . .	66
3.12	Protokoll LightCycler . . . . .	67
3.13	Verbrauchsmaterialien für die real time-PCR der CA2-Region . . . . .	68
3.14	Geräte mit Software für die real time-PCR der CA2-Region . . . . .	69
3.15	Verbrauchsmaterialien für die long range-PCR . . . . .	73
3.16	Geräte mit Software für die long range-PCR . . . . .	73
3.17	Sequenzen von Primern und Probes der long range-PCR . . . . .	74
3.18	Protokoll long range-PCR für ein Reaktionsvolumen von 50 $\mu$ l . . . . .	75
3.19	Protokoll Thermal Cycler . . . . .	76
4.1	Ergebnisse der Quantifizierung von Lipofuszin in der CA1-Region . . . . .	78
4.2	Ergebnisse der Quantifizierung von Lipofuszin in der CA2-Region . . . . .	80
4.3	Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Muskelhomogenat mit real time-PCR . . . . .	83
4.4	Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Hirnhomogenat mit real time-PCR . . . . .	84
4.5	Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA von Pyramidenzellen der CA2-Region mit real time-PCR . . . . .	85



# 1 Theoretischer Hintergrund

## 1.1 Der Alterungsprozess

### 1.1.1 Begriffsbestimmung

Mit dem Begriff des “Alterns“ werden in der deutschen Sprache sowohl physiologische, als auch pathologische Prozesse zusammengefaßt, welche sich nach der vollendeten Entwicklung des Individuums bzw. nach dem Erreichen des Erwachsenenalters ereignen [1].

Eine differenzierte Betrachtung des Alterungsprozesses, im Englischen durch die Unterscheidung in *aging* und *senescence* verdeutlicht, spiegelt sich in der deutschen Nomenklatur nicht wieder. Das englische *aging* findet bei der Beschreibung aller zeitbezogener Prozesse Anwendung, allerdings im Sinne physiologischer Abläufe, welche durchaus auch positive Aspekte im Sinne einer Reifung beinhalten können.

*Senescence* hingegen steht für pathophysiologische Mechanismen und bezeichnet ein Akumulieren von Veränderungen, welche die Wahrscheinlichkeit von Krankheit und Tod erhöhen [2, 3]. Andere Autoren bezeichnen *senescence* als eine Abnahme der individuellen Leistungsfähigkeit und Fitness mit fortschreitendem Alter [4].

Die nachfolgende Definition des Alterns enthält Aspekte aus beiden Kategorien. Vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit, der “CreaLife-Studie“, in welcher dem “gesunden Altern“ besondere Bedeutung beigemessen wurde, werden pathophysiologische und neurodegenerative Mechanismen verstärkt berücksichtigt.

### 1.1.2 Definition des Alterungsprozesses

Der Alterungsprozess kann anhand von fünf charakteristischen Gruppen altersassoziierter Veränderungen beschrieben werden.

1. Erhöhte Mortalität nach vollendeter Entwicklung.
2. Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung von Geweben.
3. Fortschreitende Verminderung der physiologischen Kapazität.
4. Abnahme der Fähigkeit des Organismus, sich gegenüber Stimuli aus der Umwelt adaptiv zu verhalten.
5. Erhöhte Vulnerabilität für Krankheiten.

## 1.1 Der Alterungsprozess

### **Erhöhte Mortalität nach vollendeter Entwicklung**

Anfang des 19. Jahrhunderts machte Compertz eine Beobachtung, welche auch heute noch Gültigkeit besitzt: die exponentielle Zunahme der Mortalität mit dem Alter [5].

So bezifferte sich die Anzahl der Todesfälle in Amerika 1995 in der Gruppe der 25-44 Jährigen auf 189,5/100.000, für die Gruppe der über als 65 Jährigen belief sie sich auf 5.069/100.000, was einer mehr als 25fachen Zunahme entspricht [6]. Dieses altersassoziierte Phänomen ist in ähnlicher Form bei allen Spezies, auch bei wirbellosen Tieren und Einzellern, beobachtbar [7].

### **Altersassoziierte Veränderungen der Zusammensetzung von Geweben**

Beim Menschen nimmt die fettfreie Körpermasse und die Knochenmasse mit zunehmendem Alter ab [8, 9]. Auch die Menge des subkutanen Fettgewebes bleibt entweder gleich oder ist vermindert, wohingegen sich der Gesamtkörper-Fettgehalt nicht verändert. Dies bedeutet de facto eine Vermehrung des Fettgewebes mit dem Alter [8].

Auf zellulärer Ebene wurden in unterschiedlichen Geweben und Organismen vielfältige Biomarker für Alterung beschrieben [10].

Zwei der erstbeschriebenen waren in den 70er Jahren das Akkumulieren von Lipofuszin, auch "aging pigment" genannt und die vermehrte Vernetzung von Molekülen der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen [11, 12]. Auf die Eigenschaften des Pigments Lipofuszin und dessen Anreicherung in postmitotischen Zellen, besonders in Neuronen, wird wegen seiner zentralen Bedeutung in der vorliegenden Arbeit nochmals gesondert eingegangen.

Weitere Beispiele schließen sowohl Veränderungen in der Expression von spezifischen Genen, als auch in der Aktivität von Protein-Biosynthese und Oxidation mit ein [10, 13].

### **Fortschreitende Verminderung der physiologischen Kapazität**

Viele altersbezogene Veränderungen sind durch Quer- und Längsschnittstudien beim Menschen dokumentiert. Beispiele sind eine Verminderung von glomerulärer Filtrationsrate, maximaler Herzfrequenz und Vitalkapazität [8]. Diese physiologischen Phänomene sind allerdings intra- und interindividuell einer starken Varianz unterworfen [14, 15].

### **Verminderte Adaptationsfähigkeit gegenüber Stimuli der Umwelt**

Ein grundlegendes Charakteristikum des Alterns ist die verminderte Fähigkeit des Organismus, die Homöostase aufrecht zu erhalten [16]. Dies manifestiert sich primär nicht in Veränderungen der Ruheparameter, sondern vielmehr in der verzögerten Antwort auf externe Stimuli wie Anstrengung oder Fasten. Aus den verminderten Reserven resultiert eine geringer ausgeprägte und verzögerte Maximalantwort. Zudem ist anschließend die zum Erreichen des Ruheniveaus notwendige Zeit verlängert. Ein Beispiel ist die Induktion der hepatischen Tyrosin-Aminotransferase durch Fasten, welche beim gealterten Nager sowohl vermindert als auch zeitlich verzögert ist [16].

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

### **Erhöhte Vulnerabilität für Krankheiten**

Die Inzidenz bestimmter Pathologien steigt mit dem Alter exponentiell an, was letztlich auch eine Ursache für den exponentiellen Anstieg der Gesamtmortalität ist [17]. Verglichen mit dem Kollektiv der 25-44 Jährigen nehmen die fünf Haupttodesursachen bei den über 65 Jährigen relativ gesehen folgendermaßen zu: Herzkrankheiten 92fach, maligne Tumore 43fach, Schlaganfall und chronische Lungenerkrankungen mehr als 100fach, Pneumonie und Influenza 89fach [6]. Warum es zu diesem dramatischen Anstieg der Mortalität kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch anzunehmen, dass Veränderungen auf zellulärer Ebene, welche zu einer Gewebs- und Organdysfunktion führen und systemische Erkrankungen zur Folge haben, eine wichtige Rolle spielen.

### **1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen**

Bislang wurden zahllose Hypothesen über die Ursachen des Alterns publiziert [18] - ein Autor bezifferte sie auf über 300 [19] - was zum einen auf die sehr komplexe Natur des Alterungsprozesses hinweist und es zum anderen erschwert, einen Überblick über die diversen Theorien zu geben.

In der vorliegenden Arbeit werde ich mich darauf beschränken, eine in meinen Augen sinnvolle Gliederung vorzustellen und anhand dieser exemplarisch wichtige aktuelle Theorien und deren Entwicklung aufzuzeigen.

Seit dem frühen 20. Jahrhundert beschäftigt sich die Biologie sehr intensiv mit dem Altern und dessen Ursachen. Eine Einteilung der entwickelten Hypothesen ist nach dem fachlichen Teilgebiet der Biologie, in welchem sie entstanden sind, möglich. Zunächst bearbeiteten überwiegend Evolutionsbiologen die Fragestellungen der Altersforschung, in letzter Zeit tun dies vermehrt auch Molekular- und Zellbiologen [4]. Evolutionsbiologen nehmen durch die Evolution bedingte Gründe für das Altern an, Molekular- und Zellbiologen vertreten dagegen mechanistische Lösungsansätze.

Die Evolutionsbiologie begann sich wegen den scheinbar mit der Evolutionstheorie Darwins im Widerspruch stehenden Eigenschaften des Alterns, mit diesem Themengebiet zu befassen. Außerdem wurde die evolutionäre Entwicklung der Lebensspanne als ein Paradigma für die Evolution komplexer Phänotypen angesehen.

Molekular- und Zellbiologen interessierten sich zunehmend für die Problematik des Alterns als sich zeigte, dass sich altersassoziierte Fehlfunktionen und die Lebensspanne gut mit ihren Standardmethoden untersuchen ließen.

Obwohl viel unternommen wurde, evolutionäre und mechanistische Ursachen des Alterns zu verstehen, herrscht bis heute kein Konsens über die relative Gewichtung vorgeschlagener molekularer Mechanismen und den Beitrag unterschiedlicher evolutionärer Prozesse zum Altern [4, 20].

In der Gruppe evolutionstheoretischer Ansätze wird auf folgende drei Hauptthesen näher eingegangen: die Theorie über die Akkumulation von Mutationen [21], die Theorie der entgegenwirkenden Pleiotropie [22] und die Theorie über den Verschleiß des Somas [23].

Historisch wurden mechanistische Theorien des Alterns in die Kategorie entwicklungsge-

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

netischer Ansätze und stochastischer Theorien eingeteilt. Die jeweils zugehörigen Thesen sind der Abbildung 1.1 zu entnehmen, einige werden näher erläutert.

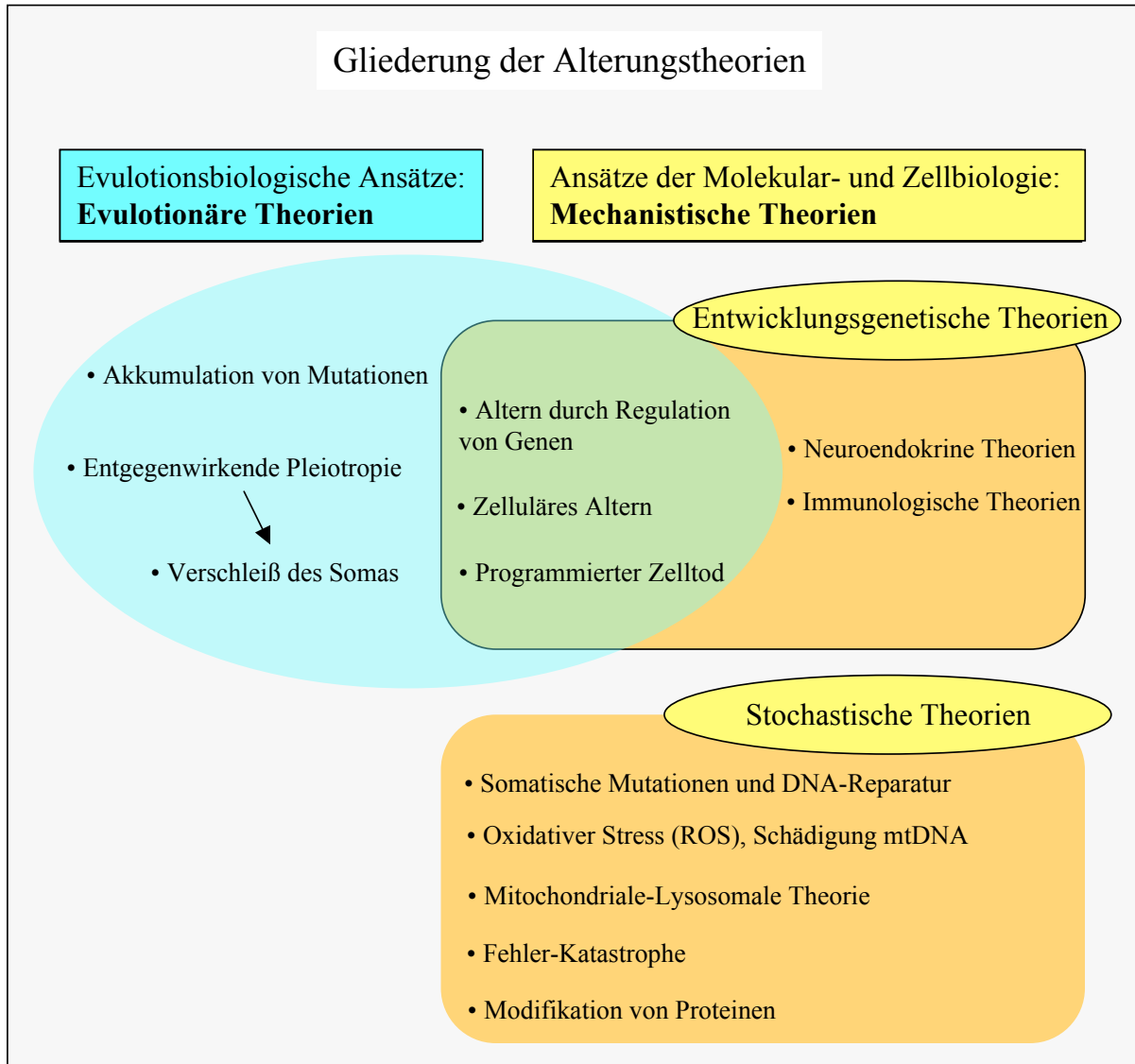


Abbildung 1.1: Gliederung und Übersicht der Theorien über das Altern

### 1.2.1 Altern aus Sicht der Evolutionstheorie

Warum altern wir? Viele Merkmale von Lebewesen sind durch ihren adaptiven Wert gegenüber der Umwelt begründet - Verhalten, Größe, Aussehen – aber welchen Sinn hat das

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

Altern? Stellt es ein Hindernis dar, welches die Evolution nicht überwinden konnte? Evolutionstheoretische Erklärungsmodelle versuchen die bemerkenswerten Unterschiede, welche man sowohl in der maximalen als auch der durchschnittlichen Lebensspanne zwischen verschiedenen Spezies beobachten kann (Beispiel Maus und Mensch), auf ein Zusammenspiel von Mutation und Selektion zurückzuführen [24]. Die evolutionstheoretischen Ansätze sind eng mit genetischen Modellen des Alterns verknüpft, denn Evolution im biologischen Sinne ist nur durch eine vererbte Manifestation des Alterns möglich. Die theoretischen Grundlagen moderner Evolutionstheorien des Alterns [21, 22, 25] wurden erst in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts geschaffen, also fast hundert Jahre nachdem Darwin seine evolutionstheoretische Theorie vorstellte [26]. Warum dies erst soviel später geschah, ist durch die Inkompatibilität des Phänomens des Alterns mit der klassischen Evolutionstheorie zu erklären. Darwins Theorie basiert auf der Vorstellung von interindividueller, zufälliger und vererbbarer Variation biologischer Charakteristika (verursacht durch Mutationen), die eine natürliche Selektion durch bevorzugte Vermehrung derer Individuen nach sich zieht, welche besonders gut an die Umwelt angepasst sind. Gesteigerte Fitness und Leistungsfähigkeit von Spezies, welche in einer erfolgreichen Reproduktion mündet, sind die erwarteten Ergebnisse der Evolution. Aus der Sicht der klassischen Evolutionstheorie sind Altern und altersassoziierte degenerative Erkrankungen somit nur schwer verständlich.

Frühe evolutionstheoretische Erklärungen, beispielsweise von A. Russel Wallace – einem Mitentdecker der natürlichen Selektion – oder August Weismann [27], schlugen einen auf die Gruppe bzw. Spezies bezogenen Selektionsvorteil vor: das Altern eliminiert demnach ältere Individuen um zu verhindern, dass diese mit ihren Nachkommen um Ressourcen konkurrieren und auf diese Weise deren Überleben gefährden.

Heute geht man davon aus, dass der Prozess der Selektion nicht auf der Ebene der Spezies sondern hauptsächlich auf der des Individuums stattfindet. Der Gedanke, das Altern als ein “Platzmachen“ für die nächste Generation zu sehen, ist also nicht sehr plausibel. Ein Individuum, welches sich nicht an den “Generationenvertrag“ hält, also weder altert noch stirbt, sondern sich weiterhin vermehrt, würde folglich mehr Nachkommen hinterlassen und somit über alternde Individuen triumphieren.

Wenn es also keinen evolutionären Vorteil des Alterns gibt, wäre eine nahe liegende Schlussfolgerung, dass es der Evolution schlichtweg nicht gelungen ist das Problem des Alterns zu beseitigen bzw. eine nicht alternde Spezies zu generieren.

Die ursprüngliche evolutionäre Theorie über das Altern vertritt den Standpunkt, dass es wegen dem mit der Lebensdauer nachlassenden Selektionsdruck in Populationen mit einer Altersstruktur zum Prozess des Alterns kommt. Populationen mit einer Altersstruktur bestehen aus Individuen unterschiedlichen Alters und weisen überlappende Generationen auf. In einer solchen Population entwickelt ein Gen, welches das Überleben und die Reproduktionsfähigkeit in einem frühen Lebensabschnitt beeinflusst, weit größeren Einfluss auf die Fitness eines Individuums im Sinne Darwins, als dies einem Gen möglich ist, das die gleichen Auswirkungen hat, diese aber erst zu einem späteren Zeitpunkt entfaltet.

Um dieses Konzept zu verstehen, ist folgendes Gedankenexperiment hilfreich. Man stelle sich eine primär nicht alternde Population vor, in welcher Mortalität und Reproduktionsrate mit dem Alter konstant bleiben. Zu Todesfällen kommt es durch altersunabhängige

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

Ursachen, beispielsweise Unfälle, natürliche Feinde und nicht mit dem Alter assoziierte Krankheiten. Man spricht hier von einer so genannten extrinsischen Mortalität. Nun nehme man an, dass eine Mutation, welche die Überlebenschancen im Erwachsenenalter beeinträchtigt, in dieser nicht alternden Population neu auftritt. Nach Hamilton [28] bestimmt der Effekt der Mutation auf die Fitness des betroffenen Individuums ihr weiteres Schicksal. Er schlug vor, dass die Fitness eines Genotypen gleichbedeutend mit seiner intrinsischen Wachstumsrate ( $r$ ) ist, welche die Wachstumsrate einer Population über einen längeren Zeitraum verbunden mit einem spezifischen Überlebens- und Reproduktionsmuster darstellt. Wenn man diese Messmöglichkeit der Fitness heranzieht, ist es möglich, Berechnungen über die Stärke des Selektionsdruckes auf eine Mutation anzustellen. Voraussetzung ist, dass diese Mutation in Veränderungen der Überlebenswahrscheinlichkeit oder Reproduktionsrate zu einem definierbaren Zeitpunkt im Leben eines Organismus resultiert. Allgemeine Schlussfolgerungen aus diesen Berechnungen kann man wie folgt zusammenfassen:

1. Der Selektionsdruck auf eine das Überleben beeinflussende Mutation ist bis zum ersten Reproduktionszyklus konstant, nimmt danach aber mit steigendem Alter immer weiter ab.
2. Was die Reproduktion betrifft, nimmt der Selektionsdruck in einer stabilen oder wachsenden Population mit dem Alter ab. Falls die Größe der Population jedoch drastisch abnimmt, kann sich der Selektionsdruck auf die Reproduktion in Ausnahmefällen mit dem Alter erhöhen. Da ein sehr schneller Rückgang der Population nicht ohne eine Gefährdung der Spezies aufrechterhalten werden kann, muss im Allgemeinen von der ersten Annahme ausgegangen werden.

Diese Schlussfolgerungen gelten auch für nicht alternde Populationen. Deswegen besteht in einer initial nicht alternden Population ein größerer Selektionsdruck auf eine Mutation, welche eine erhöhte Mortalität oder verminderte Reproduktion in einem frühen Lebensabschnitt nach sich zieht, als auf eine Mutation, die den gleichen Effekt in einem späteren Lebensabschnitt hat. Umgekehrt wird eine Mutation mit den Folgen erhöhter Überlebenswahrscheinlichkeit oder vermehrter Reproduktion in jungem Alter stärker favorisiert als eine Mutation mit gleichen Auswirkungen in höherem Alter. Über den Mechanismus des unterschiedlich ausgeprägten Selektionsdruckes entwickelt sich aus einer primär nicht alternden Population über Generationen hinweg eine Population, in welcher das Phänomen des Alterns beobachtet werden kann. Dies geht mit geringeren Überlebens- und Reproduktionsraten im hohen als im niedrigen Alter einher. Dieser Mechanismus kann sich selbst wiederum verstärken, da ein geringeres Überleben und eine verminderte Reproduktion im späten Leben zu einer geringeren Auswirkung der Selektionsmechanismen mit steigender Lebensdauer führen, so dass früher zu Tage tretende Mutationen hinsichtlich der Selektion effektiv neutral werden. Vor dem Hintergrund dieser populationsgenetischen Theorie ist die extrinsische Mortalität die grundlegende evolutionäre Ursache für den Alterungsprozess. Eine künstliche Erhöhung / Verminderung der extrinsischen Mortalität führte bei Populationen von Fruchtfliegen und Guppys zu einer Verkürzung / Verlängerung der Überlebens-

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

zeit nachfolgender Generationen [29, 30, 31, 32]. Für eine Population von Opossums ohne Fressfeinde, also einer niedrigeren extrinsischen Mortalität, konnte ebenfalls eine Verlängerung der mittleren Lebensdauer nachgewiesen werden [33]. Eine hypothetisch nicht alternde Population entwickelt sich zu einer dem Alterungsprozess unterworfenen Population, sobald einige Mutationen mit ihrem Effekt auf die Fitness einen gewissen Grad an Altersspezifität aufweisen [4]. Angenommen dieses allgemeine evolutionstheoretische Modell ist gültig, gibt es diverse Möglichkeiten, wie sich das Phänomen des Alterns entwickeln kann. Gängige Erklärungen für das Altern und eine begrenzte Lebensspanne basieren hauptsächlich auf zwei wichtigen evolutionsbiologischen Theorien: der Theorie der Akkumulation von Mutationen [21, 29] und der Theorie der entgegenwirkenden Pleiotropie [22, 34].

Sie spiegeln unterschiedliche Annahmen über die altersspezifischen Effekte von Mutationen wider. Diese beiden Theorien erfuhren seit den 50er Jahren keine grundlegenden Veränderungen mehr und werden im Folgenden kurz beschrieben.

### **Theorie der Akkumulation von Mutationen (MA)**

1952 veröffentlichte Medawar die erste moderne Theorie über das Altern [21]. Wie bereits erwähnt, ist aus der evolutionären Perspektive das Altern eine unvermeidbare Folge des nachlassenden Selektionsdruckes mit der Lebensdauer [4]. Beispielsweise wird ein mutiertes Gen, welches mit einer auf das Kindesalter begrenzten Lebenserwartung einhergeht, sehr stark selektiert, denn die Träger sterben, bevor sie die Möglichkeit haben, es an Nachkommen weiterzugeben. Dahingegen erfährt eine Mutation, deren Folge erst über 80-Jährige betrifft, keine Selektion, da die Fortpflanzung zu diesem Zeitpunkt bereits erfolgt ist. Über nachfolgende Generationen können folgenschwere Mutationen akkumulieren, deren Auswirkungen sich aber erst in einem höheren Lebensalter bemerkbar machen. Dies führt bei der betroffenen Spezies zu einer erhöhten Mortalität in einem späteren Lebensabschnitt. Da der Selektionsdruck auf eine Mutation sowohl von dem Ausmaß der schädigenden Effekte, als auch dem Alter des Auftretens derselben abhängt, sagt die Theorie über die Akkumulation von Mutationen voraus, dass viele Gene, welche zum Altern beitragen, nur einen individuell geringen Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit und Gesundheit im späten Leben haben.

Eine Mutation mit schwerwiegenden Auswirkungen, die oft als ein Beispiel der Mutationen-Akkumulationstheorie angeführt wird, ist die dominante Mutation im Huntington-Gen [35]. Aus dieser von Peter Medawar vorgeschlagenen Theorie ließen sich Vorhersagen über die Korrelation der Lebensspanne von Generationen in Abhängigkeit von der maximal erreichten Lebensdauer machen. Diese wurden anhand von Stammbäumen von Adelfamilien überprüft und erwiesen sich als richtig [36, 37, 38].

### **Theorie über die entgegenwirkende Pleiotropie (AP)**

Williams schlug 1957 die Theorie der “Antagonistic Pleiotropy“, der entgegengesetzten Auswirkung von Genen auf den Phänotyp, vor [22]. Diese postuliert, dass Gene, deren negative Eigenschaften erst im hohen Lebensalter zutage treten, aktiv akkumulieren. Dies ist

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

der Fall, wenn sie dem Träger einen Vorteil in einem früheren Lebensabschnitt verschaffen und dieser sich vermehrt fortpflanzen kann [24]. Diese Theorie macht folgende Prämissen:

1. Ein Gen tangiert nicht nur ein biologisches Merkmal, sondern mehrere biologische Eigenschaften.
2. Die von einem Gen vermittelten biologischen Effekte beeinflussen die Fitness eines Individuums in entgegengesetzter Art und Weise.

Beispielsweise können evolutionäre Veränderungen angeführt werden, welche zu einer Steigerung der Reproduktionsfähigkeit im frühen Leben und einer erhöhten Mortalität im höheren Alter führen [29].

Studien, welche von diesen Grundannahmen deduktiv abgeleitete Postulate nachweisen sollten, stellten sich im nachhinein als nicht korrekt durchdacht und durchgeführt heraus. Eine Studie, die einen Zusammenhang zwischen Infertilität und einer erhöhten Lebensspanne aufzeigen wollte, ließ soziale Gründe für die Kinderlosigkeit unbeachtet und vielen als kinderlos bezeichneten Frauen konnten durch andere Quellen dann doch Nachkommen zugeordnet werden. Nach Gavrilov [24] sind zur Klärung der Gültigkeit aus dieser Theorie abgeleiteter Annahmen noch weitere Studien notwendig.

### Theorie über den Verschleiß des Somas

Diese Theorie kann man als spezielle Variante der AP-Theorie bezeichnen und wurde erstmals 1977 von Kirkwood formuliert [39, 23, 20]. Sie geht davon aus, dass die somatische Aufrechterhaltung und Reparatur einen hohen Energieaufwand bedeuten. Energiereserven, welche für die Reproduktion aufgewendet werden, stehen nicht mehr für Aufrechterhaltung der Homöostase und Reparatur zur Verfügung. Ein Allel, welches für die verstärkte Zuweisung von Energie zum Zwecke der Reproduktion steht, hat auf die Zuteilung von Energie für Reparatur und Aufrechterhaltung einen gegenteiligen Effekt. Weiter postuliert diese Theorie, dass Organismen einen Selektionsvorteil besitzen, welche viel Energie für die Reproduktion aufbringen und der Aufrechterhaltung und Reparatur gerade soviel Energie zuteilen, dass ein akzeptabler Gesundheitszustand für die erwartete Lebensdauer gewährleistet ist. Nach diesem Modell resultiert das progressive Akkumulieren von nicht reparierten somatischen Schäden in Alterung und eventuellem Tod [4].

Eine Klassifizierung von Genen, die potentiell für den Alterungsprozess verantwortlich gemacht werden können, nimmt offensichtlich Bezug auf oben beschriebene evolutionstheoretische Ansätze. Sie unterscheidet drei Kategorien:

1. Gene, welche schädliche Mutationen tragen, deren negative Effekte aber erst in post-reproduktivem Alter Folgen für den Organismus haben und auf welche nur ein geringer Evolutionsdruck ausgeübt wird.
2. Negativ pleiotrope Gene, die in einem frühen Lebensabschnitt die Überlebenschancen verbessern, aber zu einem späteren Zeitpunkt von Nachteil sind.



## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

3. Gene, welche die Reparatur und Aufrechterhaltung der Integrität der Zelle regulieren.

Die oben genannten Theorien schließen sich nicht gegenseitig aus, beide evolutionären Mechanismen finden vielmehr zur gleichen Zeit statt. Hauptunterschied ist, dass sich bei der Theorie über das Akkumulieren von Mutationen mit negativen Effekten im hohen Lebensalter die Gene von Generation zu Generation passiv ansammeln, während die Gene in der Theorie der entgegenwirkenden Pleiotropy durch Selektion aktiv im Genpool gehalten werden [40].

Der relative Beitrag der einzelnen Mechanismen zum Alterungsprozess einer Spezies wurde bislang noch nicht festgestellt und ist Gegenstand aktueller Forschung der Evolutionsbiologie.

### 1.2.2 Mechanistische Theorien über das Altern: Überblick

Die Zahl der mechanistischen Theorien über das Altern wird auf einige Hundert geschätzt [19], nach Ergebnissen aktueller Forschung fokussiert sich die Aufmerksamkeit aber auf einige wenige [4]. Aus dem historischen Kontext heraus ist eine Einteilung der Theorien des Alterns in die beiden folgenden Kategorien üblich [1].

1. Stochastische Theorien bzw. Fehler-Theorien.
2. Entwicklungsgenetische Theorien bzw. Programm-Theorien.

Die den jeweiligen Kategorien zugeordneten Theorien können Abbildung 1.1 entnommen werden.

### 1.2.3 Stochastische Theorien

Nach den stochastischen Theorien des Alterns wird das Altern durch zufällig auftretende Schädigungen auf molekularer Ebene verursacht. Diese Schäden akkumulieren und resultieren in einem physiologischen Rückgang der Leistungsfähigkeit, einem wichtigen Charakteristikum des Alterns.

### Somatische Mutationen und Reparatur von DNA

Die Theorie, dass Altern über Mutationen in somatischen Zellen vermittelt wird, ist eine der prominentesten unter den stochastischen Theorien. Postuliert wird die ständige Exposition von DNA gegenüber schädigenden Einflüssen, beispielsweise oxidativem Stress oder der Hintergrundstrahlung. Daraus resultieren Mutationen, die einen funktionellen Verlust und letztendlich den Tod zur Folge haben [41]. Beispielsweise korreliert die Fähigkeit von Zellkulturen, welche von Spezies mit unterschiedlicher Lebenserwartung gewonnen wurden, durch UV-Licht induzierte Schäden in der DNA zu reparieren, direkt mit deren maximaler Lebensspanne [42, 43].

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

### Die Fehler-Katastrophe-Theorie

Die Fehler-Katastrophe-Theorie besagt, dass zufällig auftretende Fehler in der Synthese auch Proteine betreffen können, welche bei wichtigen Abläufen in der Zelle eine bedeutende Rolle spielen. Als Beispiel kann man Proteine der DNA-Synthese anführen [44].

Durch den physiologischen Umsatz von Proteinen würden fehlerhafte Moleküle nach kurzer Zeit aus der Zelle eliminiert. Ist aber ein Protein betroffen, dessen Funktion die Synthese von Proteinen ist, so besteht die Möglichkeit, dass es nachfolgend zu einer Amplifikation fehlerhafter Moleküle kommt. Deren Akkumulieren würde in einer "Fehler-Katastrophe" resultieren und wäre mit einer regelrechten physiologischen Funktion und dem Überleben des Gesamtorganismus nicht vereinbar.

Obwohl es Hinweise für ein gehäuftes Auftreten geschädigter Proteine mit zunehmendem Alter gibt, fehlt bislang jegliche Evidenz für eine altersassoziierte fehlerhafte Synthese von Proteinen [1]. Das Vorhandensein geschädigter Proteine im höheren Lebensalter ist vielmehr auf eine vermehrte posttranslationale Schädigung zurückzuführen. Deren Mechanismen werden im Folgenden kurz erläutert.

### Theorie über die Modifikation von Proteinen

Im Zusammenhang mit dem Altern kommt es zu quantitativen und qualitativen Veränderungen von Proteinen. Qualitative Veränderungen führen über eine Verminderung der Enzym-Spezifität und einen erhöhten Gehalt an Carbonyl zu funktionellen Veränderungen [45]. Als Ursachen werden Oxidation und Glykosylierung diskutiert. Ein vermehrtes Anfallen von derart veränderten Molekülen kann funktionelle Einschränkungen auf Zell- und Organebene zur Folge haben [12, 46].

Mit der Überexpression der Protein-Carboxyl-Methyltransferase, deren Funktion die Reparatur geschädigter Proteine ist, ließ sich bei Fruchtfliegen eine Verlängerung der Lebensdauer erzielen [47]. Unter bestimmten Umständen könnte die Reparatur von Proteinen folglich Einfluss auf die Lebensspanne haben.

### Free Radical Theory of Aging (FRTA) - oxidativer Stress - Mitochondriale DNA

Eine der heute am meisten beachteten Theorien wurde 1956 erstmals von Harman vorgestellt [48] und basiert in seiner heutigen Form auf der natürlichen Instabilität unseres Genoms [49]. Er postulierte als Ursache des Alterns den Mechanismus der Schädigung von Bestandteilen der Zelle durch freie Radikale (ROS). Diese sind hoch reaktive Atome oder Moleküle mit unpaarigen Elektronen, vornehmlich freie Sauerstoff-Radikale. Auf ihre Entstehung wird in Kapitel 1.5.2 detailliert eingegangen.

Die Theorie über den Zusammenhang freier Radikale mit dem Alterungsprozess (FRTA) entwickelte sich mit dem wachsendem Wissen über das ubiquitäre Vorkommen freier Radikale in diversen Stoffwechselreaktionen [50]. Wichtig war auch die Annahme eines einzigen, in allen Lebewesen ablaufenden und für das Altern verantwortlichen Prozesses. Dieser

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

könnte über genetische Faktoren oder Umwelteinflüsse modifiziert werden.

1972 wurde die FRTA erstmals um folgende Vorschläge erweitert [51]:

1. Entstehung der meisten freien Radikale im Rahmen des normalen Zellmetabolismus in den Mitochondrien in Form von Superoxid-Radikalen ( $O\cdot$ )
2. Die Lebensdauer wird in erster Linie vom Ausmaß der Schädigung des Mitochondriums bestimmt, insbesondere der mtDNA.

1983 diskutierte Harman die sich aus der Alterung der Mitochondrien ergebenden Konsequenzen [52].

1998 postulierte er einen Zusammenhang zwischen einer Verbesserung der Lebensumstände und der Zunahme der mittleren Lebenserwartung. Diese sei durch eine Verminderung des mit suboptimalen Lebensbedingungen assoziierten oxidativen Stresses bedingt [53, 54].

2002 definierte Harman den Alterungsprozess als die Summe der durch freier Radikale verursachten Schäden, die einerseits mit suboptimalen Lebensbedingungen assoziiert sind, andererseits durch den angeborenen Alterungsprozess ("Inborn Aging Process") produziert werden [55].

Um wichtige Mediatoren von oxidativem Stress einzuschließen, die im eigentlichen Sinne keine freien Radikale sind, wie zum Beispiel Peroxide oder Aldehyde, wurde die Theorie von anderen Autoren in die "Oxidativer Stress Theorie des Alterns" abgewandelt [56]. Grundlage dieser Variante ist das physiologische Vorkommen von oxidativem Stress unter Normalbedingungen in allen aeroben Organismen [57]. Diese chronische Exposition der Zelle gegenüber oxidativem Stress ist auf ein Ungleichgewicht von Oxidantien und Anti-Oxidantien zurückzuführen und hat ein kontinuierliches Akkumulieren von geschädigten Makromolekülen mit dem Alter zur Folge. Diese führen zu einem progressiven Verlust der funktionellen Effizienz diverser in der Zelle ablaufender Reaktionen und Prozesse [58]. Auf der Grundlage der FRTA entwickelten sich Hypothesen, welche die Rolle verschiedener Organellen besonders hervorheben. Eine der prominentesten ist die Mitochondriale Theorie des Alterns. Diese postuliert einen *circulus vitiosus* aus einer zunehmenden Dysfunktion der Atmungskette und einem dadurch vermehrten Entstehen freier Radikale. Diese generieren Mutationen in der mtDNA, auf welcher Bestandteile der Atmungskette kodiert sind, was deren Effizienz wiederum beeinträchtigt [51, 59, 60]. Am Ende dieses Teufelskreises aus Mutation und exponentiell ansteigender Produktion von ROS stehen Apoptose, Organversagen und Seneszenz [61].

In Tiermodellen konnte die lebensverlängernde Wirkung einer verstärkten Expression antioxidativer Enzyme nachgewiesen werden [62, 63], was für eine zentrale Rolle des oxidativen Stress beim Alterungsprozess spricht. Für weitere Erläuterungen zu möglichen genetischen Manipulationen siehe Kapitel 1.4.5.

Eine mit dem Alter assoziierte Zunahme von Punkt-Mutationen und Deletionen ist durch zahlreiche Publikationen gut belegt [64, 65, 66, 67, 68, 69, 59].

Ob die Mutationen funktionell relevant und ursächlich für den Alterungsprozess verantwortlich sind, wird derzeit kontrovers diskutiert [70, 71, 72, 73, 74, 75].

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

### Theorie über die mitochondriale-lysosomale Achse des Alterns

Diese sehr interessante, aber noch relativ wenig beachtete Theorie ist im Grunde als eine weitere Variante der FRTA anzusehen. Sie postuliert in der Interaktion von Mitochondrien und Lysosomen einen wichtigen Beitrag zum Alterungsprozess postmitotischer Zellen [76]. Als Folge einer unvollständigen Degradierung von oxidativ geschädigten Makromolekülen und Zellorganellen nach Autophagozytose akkumuliert insbesondere in postmitotischen Zellen, beispielsweise Neuronen und Kardiomyozyten, „Zellschrott“. Dieser setzt sich aus defekten Mitochondrien und anderen Organellen, abberanten Proteinen und dem „Alterungspigment“ Lipofuszin zusammen [77]. Auf Einzelheiten der Akkumulation und Eigenschaften von *Lipofuszin* wird unter 1.6 eingegangen. Durch die mit dem Alter zunehmende Überladung der Lysosomen mit Lipofuszin wird unter anderem ihre Funktion der Autophagozytose von alten Mitochondrien beeinträchtigt. Der Umsatz der Mitochondrien nimmt mit dem Alter ab. Ein vermehrtes Auftreten von Mitochondrien, deren Produktion von ATP vermindert, von ROS jedoch erhöht ist, verstärkt den Mechanismus der Schädigung von Mitochondrien und Lysosomen durch oxidativen Stress, triggert pro-apoptische Signalwege und mündet letztendlich im Tod der Zelle [76, 78, 77, 79, 80, 81].

#### 1.2.4 Entwicklungsgenetische Theorien

Entwicklungsgenetische Theorien sehen das Altern als Teil eines Kontinuums von Entwicklung und Reifung, welches genetisch determiniert ist. Allerdings steht der eher generalisierte Prozess des Alterns im Gegensatz zu den sehr präzise und kontrolliert ablaufenden Entwicklungsprozessen [1]. Für einen entwicklungsgenetischen Ansatz spricht die für eine Spezies sehr spezifische maximale Lebensdauer.

Im Folgenden werden einige entwicklungsgenetische Ansätze besprochen.

#### Altern durch Regulation von Genen

Nach der Gen-Regulations-Theorie des Alterns ist der Alterungsprozess Ergebnis von Veränderungen in der Expression von Genen [82]. Offensichtlich sind Veränderungen in der Expression diverser Gene mit dem Alter vorhanden [83, 84, 85, 86]. Vor einem evolutionsbiologischen Hintergrund ist es aber eher unwahrscheinlich, dass eine direkte Selektion von Genen stattfindet, die den Alterungsprozess vermitteln [87]. Wahrscheinlicher ist vielmehr eine Selektion von Genen, die einen positiven Einfluss auf die Überlebensdauer haben.

Es wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Modifikation zu einer Veränderung der Überlebenszeit führt (siehe 1.4.5). Viele von Ihnen spielen eine Rolle im Zellmetabolismus bzw. Energiehaushalt, beim Wachstum und in der Resistenz gegenüber oxidativem Stress [1]. Einige Autoren verweisen auf Tiermodelle eines beschleunigten Alterungsprozesses [70] und auch beim Menschen existieren Erkrankungen die eine Beschleunigung des Alterns imitieren (Hutchinson-Gilford-, Werner-Syndrom). Da aber diverse genetische Veränderungen zu einer Verkürzung der Überlebenszeit führen und das Übereinstimmen der Modelle mit dem physiologischen Altern fraglich ist [74], können sie allenfalls als wertvolle Hilfsmittel bei der Identifikation molekularer Mechanismen des Alterns betrachtet werden [1].

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

### Neuroendokrine Theorien

Die *Neuroendokrine Theorie des Alterns* postuliert eine zentrale Rolle der schrittweisen funktionellen Einschränkung von Neuronen und der mit ihnen assoziierten Hormone [88]. Eine bedeutende Version dieser Theorie spricht dem Steuermechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren- Achse eine bedeutende Rolle für das Altern zu. Das neuroendokrine System reguliert sowohl die gesamte Entwicklung des Menschen und dessen Reproduktivität, als auch dessen Metabolismus und eine Vielzahl weiterer physiologischer Abläufe. Mögliche Veränderungen in diesem System können also den gesamten Organismus betreffen.

Nagetiere, welche nach einer Hypophysektomie mit Hormonen substituiert wurden, hatten eine normale oder sogar erhöhte Lebensspanne [89]. Auch ist die altersbedingte Reduktion des Neurotransmitters Dopamin in kurzlebigen Rattenstämmen deutlicher ausgeprägt [90] und die Gabe von Levodopa verlängert die Überlebenszeit von Mäusen [91]. Die Gabe von L-Deprenyl, einem Aktivator nigrostriataler dopaminergischer Neurone, verlängerte sowohl die durchschnittliche, als auch die maximale Überlebenszeit von Ratten [92, 93]. Trotz dieser Hinweise auf eine Beteiligung des neuroendokrinen Systems bei der Seneszenz bleibt seine ursächliche Wirkung fraglich. Veränderungen im neuroendokrinen System könnten auch eine sekundäre Manifestation eines grundlegenden, alle Zellen betreffenden Alterungsprozesses sein. Parallelen im phänotypischen Altern findet man zudem auch bei höheren Wirbeltieren ähnlichen Organismen ohne komplexes neuroendokrines System [1].

### Immunologische Theorien

Die *Immunologische Theorie des Alterns* basiert auf zwei Beobachtungen:

1. Die Abnahme der Leistungsfähigkeit des Immunsystems mit zunehmendem Alter.
2. Die Zunahme autoimmuner Reaktionen mit dem Alter, beispielsweise einer Erhöhung von Autoantikörper-Titern im Serum [94].

Des Weiteren wurde eine Verschiebung in Richtung eines vermehrten Anteils an Gedächtnis-T-Zellen in Verbindung mit einer verstärkten Expression des multidrug-resistance P-Glykoproteins beschrieben [95]. Außerdem besteht eine Korrelation von maximaler Lebensspanne und den Genen bestimmter major Histokompatibilitäts-Komplexen [96]. Caruso et al. schlugen verschiedene Mechanismen für einen Zusammenhang von Histokompatibilitäts-Genen mit der Lebensdauer vor, und zwar in Mäusen über eine erhöhte Vulnerabilität für Lymphome, beim Menschen über eine gesteigerte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten [97].

Das Immunsystem spielt unbestritten eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gesundheit, allerdings kann man gegen diese Theorie die gleichen Kritikpunkte anführen wie gegen die *Neuroendokrine Theorie des Alterns*. Ein komplexes Immunsystem ist in Organismen, die Aspekte des Alterns mit höheren Vertebraten teilen, oftmals nicht vorhanden.

## 1.2 Theorien über den Alterungsprozess und seine Ursachen

Eine Unterscheidung von grundlegenden Alterungsmechanismen und sekundären Veränderungen, die durch ein gealtertes Immunsystem vermittelt werden, fällt wiederum schwer [1].

### Zelluläres Altern

Aspekte des zellulären Alterns wurden in den 60er Jahren von Hayflick und Moorhead in Zellkulturen untersucht [98]. Sie beschrieben erstmals das "Hayflick limit", das Phänomen des Sistierens der Zellteilung nach einer charakteristischen Anzahl von Replikations-Zyklen [99]. Eine Unterscheidung in folgende Formen des Zellulären Alterns kann vorgenommen werden [100]:

1. Replikatives Altern: die Zelle ist nur zu einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen befähigt.
2. Altern durch andere Ursachen, beispielsweise auf Grund einer Exposition gegenüber Stress.

Die spezielle Variante des Replikativen Alterns wird auf die mit jeder Teilung der Zelle abnehmende Länge der Telomere zurückgeführt [101]. Die Verkürzung der Telomere wird von einigen Autoren als die "Biologische Uhr" der Zelle bezeichnet [102]. Über den Anteil der Dauer der replikativen Phase am physiologischen Alterungsprozess wird derzeit kontrovers diskutiert.

Mit Hilfe der Insertion des Enzyms Telomerase konnte einerseits eine Verlängerung der Überlebenszeit erzielt und replikatives Altern verhindert werden [103]. Andererseits entwickelten Mäuse mit verkürzten Telomeren und einer defizienten Telomerase erst nach mehreren Generationen deutliche Charakteristika für ein beschleunigtes Altern [104, 105, 106]. Auch konnte in "unsterblichen" Zellen eine Expression der Telomerase nachgewiesen werden [107], es wurden aber auch gegenteilige Beobachtungen beschrieben [108].

Eine zentrale Rolle beim zellulären Altern scheint auch das Tumor-Suppressor-Gen p53 zu spielen, möglicherweise in Interaktion mit diversen Formen des Stress und einer Dysfunktion der Telomere [99]. Die Ausprägung eines schnell alternden Phänotyps Telomerase-defizienter Mäuse konnte durch eine mangelnde Expression von p53 vermieden werden, auch wenn die mittlere Überlebensdauer durch eine gesteigerte Inzidenz von Karzinomen vermindert war [109]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen hatte eine Überexpression von p53 sowohl ein schnelleres Altern, als auch ein selteneres Auftreten von Tumoren zur Folge [110].

Diese Sicht des zellulären Alterns ist durchaus mit anderen Theorien der Akkumulation von Schädigungen (oxidativer Stress etc.) vereinbar und macht auch unter dem evolutionsbiologischen Gesichtspunkt der entgegengesetzten Pleiotropie Sinn. Für die Optimierung der Lebensdauer ist das Ausmaß der Reaktion der Zelle (Expression von p53) auf Schädigungen entscheidend. Fällt sie zu gering aus wird die Lebensdauer durch eine erhöhte Karzinogenese erniedrigt, fällt sie zu hoch aus durch einen beschleunigten Alterungsprozess. Altern könnte der Preis für die Vermeidung von Karzinomen sein [1].

#### Programmierter Zelltod (PZT)

Der programmierte Zelltod ist der “Selbstmord“ einer Zelle in einem mehrzelligen Organismus. Im Gegensatz zur Nekrose, welche meist Folge einer akuten Schädigung der Zelle ist und von einer inflammatorischen Reaktion begleitet wird, stellt der PZT einen kontrolliert ablaufenden Prozess dar [111]. Dieser ist für die Entwicklung und das Überleben des Gesamtorganismus von existentieller Bedeutung. Störungen begünstigen das Auftreten von Tumoren und die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen [112, 113].

1842 beschrieb Vogt erstmals im Rahmen seiner Untersuchungen der Ontogenese von Wirbeltieren den PZT [114], 1972 wurde der Begriff der Apoptose in Abgrenzung zur Nekrose eingeführt [115]. Es existieren diverse Mechanismen, die letztlich den Tod der Zelle hervorrufen, diese werden im Rahmen dieser Arbeit aber nicht im Detail besprochen. Grob kann man, auch hinsichtlich der morphologischen Veränderungen, folgende Wege der Apoptose unterscheiden [116]:

1. Klassische oder Caspase-abhängige Apoptose: Es findet eine Kondensation des Chromatins und Phosphatidylserin-Externalisierung (“eat me“-Signal für Makrophagen) statt. Weitere Merkmale sind beispielsweise das Schrumpfen des Zytoplasmas und die Zeiose.
2. Der Begriff des “apoptoseartigen programmierten Zelltodes“ wird verwendet, um eine Form des Caspase-unabhängigen Zelltodes zu beschreiben. Die Chromatin-Kondensation ist hier weniger stark ausgeprägt, andere Merkmale der Apoptose sind aber vorhanden.
3. Keine oder allenfalls eine “fleckige“ Kondensation des Chromatins findet sich beim “nekroseartigen programmierten Zelltod“, bei dem die anderen morphologischen Charakteristika der Apoptose in variabler Ausprägung beobachtet werden können.

Eine andere Einteilung nach dem Ort der Initiation unterscheidet in Typ I- und Typ II-Apoptose. Für den Typ I ist ein rezeptorvermittelter Start der Caspase-Kaskade mit direkter Aktivierung der Caspase-3 durch die Caspase-8 charakteristisch [117]. Die Typ II-Apoptose wird dagegen mitochondrial vermittelt und führt zur Aktivierung der Caspase-9 [118, 119].

Zusammenfassend spielen möglicherweise wieder die Mitochondrien eine bedeutende Rolle bei der Induktion des PZTs als Antwort auf interne und externe Stimuli.

### 1.3 Lebenserwartung und maximale Lebensdauer

Die durchschnittliche Überlebenszeit (Lebenserwartung zum Zeitpunkt der Geburt) des Menschen erfuhr in den letzten Jahrhunderten eine enorme Steigerung. Die maximale Lebensdauer erhöhte sich ebenfalls, wenn auch deutlich geringer ausgeprägt. Vor allem die Gesellschaftsstruktur der Industrienationen weist einen stetig wachsenden Anteil älterer Individuen an der Gesamtbevölkerung auf, die von Ihnen verursachten Kosten im Gesundheitswesen stiegen deutlich an [120].

## 1.3 Lebenserwartung und maximale Lebensdauer

### 1.3.1 Lebenserwartung

Die Lebenserwartung ist die statistische Bestimmung der durchschnittlichen Lebensdauer einer Spezies. Häufig wird sie nach Geschlecht und geografischer Lokalisation getrennt angegeben. Theoretisch ist mit der Lebenserwartung die noch verbleibende Lebenszeit gemeint und kann mit Hilfe von Sterbetafeln für jedes Alter angegeben werden, meist wird sie jedoch als die zu erwartende Lebensdauer zum Zeitpunkt der Geburt verwendet.

In der Menschheitsgeschichte kam es durch Veränderungen in der Umwelt und Ernährung, sowie den technischen und medizinischen Fortschritt, zu einer deutlichen Steigerung der Lebenserwartung, dargestellt in Abbildung 1.2.

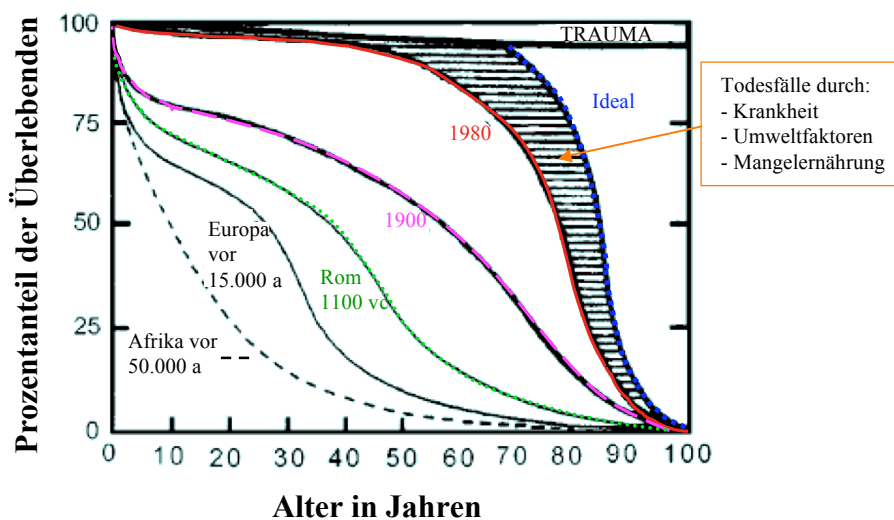


Abbildung 1.2: Prozentanteil der Überlebenden für ein bestimmtes Alter (in Jahren) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Menschheitsgeschichte. Die deutliche Steigerung der durchschnittlichen Überlebensrate ist auf Unterschiede in den herrschenden Umweltbedingungen, der Ernährung und medizinischen Versorgung zurückzuführen. Die Erhöhung der maximalen Lebensspanne ist geringer ausgeprägt. Modifiziert nach [121]

### 1.3.2 Maximale Lebensdauer

Als die maximale Lebensdauer bezeichnet man die höchste beobachtete Überlebensdauer eines Individuums einer Gruppe bzw. Spezies. In Tierstudien, so auch in der vorliegenden Arbeit, wird die maximale Lebensdauer aber meist als die durchschnittliche Lebensdauer der ältesten 10 % der Tiere einer Kohorte definiert [63].



## 1.4 Möglichkeiten der Lebensverlängerung

### 1.3.3 Die “Gesunde Lebensdauer“

Vor einem gesundheitspolitischen Hintergrund spielt das “gesunde Altern“ eine wichtige Rolle. Als die gesunde Lebensdauer wird die Lebenszeit definiert, in welcher keine Hinweise auf Krankheit auszumachen sind. Um die Auswirkungen von Kreatin auf die gesunde Lebensdauer beurteilen zu können, wurde in der CreaLife-Studie die Evaluation des Gesundheitszustandes der Tiere mit besonderer Sorgfalt durchgeführt. Für Einzelheiten bezüglich der Definition von Krankheit siehe 3.1.4.

## 1.4 Möglichkeiten der Lebensverlängerung

Bislang wurden zahlreiche Möglichkeiten der Lebensverlängerung beschrieben, meist in Tiermodellen von Nematoden und Mäusen. Angriffspunkte sind meist die Stoffwechselaktivität oder die direkte Beeinflussung des oxidativen Stress. Da in Tiermodellen erfolgreiche genetische Modifikationen derzeit nicht auf den Menschen übertragbar sind, spielen ernährungsbiologische Ansätze eine besondere Rolle in der potentiellen Lebensverlängerung beim Menschen [60].

### 1.4.1 Erniedrigung der Temperatur

Bei wechselwarmen Spezies bzw. Kaltblütern kann die maximale Lebensspanne durch eine Verringerung der Temperatur um 10 % °C bei der Hausfliege um bis zu 250 % gesteigert werden [56]. Eine mögliche Erklärung ist die verminderte metabolische Aktivität und die dadurch verminderte Produktion freier Radikale, was wiederum in einer geringeren Schädigung von Proteinen und DNA resultiert.

### 1.4.2 Verminderung der Aktivität

Der gleiche Mechanismus liegt wohl der lebensverlängernden Wirkung der künstlichen Immobilisation von Fliegen zu Grunde. Durch eine Elimination der Flugfähigkeit konnte eine ähnliche Steigerung der maximalen Lebensdauer wie durch Temperaturverminderung erreicht werden [56].

### 1.4.3 Kalorienreduktion ohne Mangelernährung

Die am besten reproduzierbare und derzeit potenteste diätische Maßnahme ist die kalorische Restriktion (KR) ohne Mangelernährung [100]. Durch eine Restriktion der aufgenommenen Kalorien auf 30–70 % bei gleichbleibender Substitution von Nahrungsbestandteilen wie Mineralien und Vitaminen konnte für verschiedene Spezies, unter anderem Säugetiere und Würmer, eine Verlängerung der mittleren und maximalen Lebensdauer um mehr als 50 % nachgewiesen werden [122, 123, 124]. Neben dem Ausmaß der Kalorienreduktion hängt die Überlebenszeit auch von Faktoren wie der Spezies, dem Alter zu Beginn der Diät und einigen weiteren Variablen ab [125].

Unter KR entwickeln sich, verglichen mit alternden ad libitum gefütterten Kontrolltieren,

## 1.4 Möglichkeiten der Lebensverlängerung

physiologische und pathologische altersassoziierte Veränderungen zeitlich verzögert [126]. Über welchen Mechanismus der lebensverlängernde Effekt von KR auf molekularer Ebene vermittelt wird ist noch nicht exakt bekannt. Außer der Lebensspanne scheint die KR auch den Stoffwechsel (z.B.: Erhöhte Empfindlichkeit des Gewebes für Insulin), das Immunsystem und das neuroendokrine System (z.B.: gesteigerte Resistenz gegenüber Stress, Infektionen und Karzinomen) positiv zu beeinflussen [127]. Solche funktionellen Veränderungen sind sehr wahrscheinlich auch in einem Zusammenhang mit Veränderungen im Expressionsprofil bestimmter Gene zu sehen. Der Vergleich von Expressions-Profilen von Tieren unter KR mit dem von gealterten Tieren der Kontrollgruppe zeigte signifikante Modifikationen. Für Gene, welche durch eine Up-Regulation mit dem Alter charakterisiert sind, konnte unter KR bei 24 % keine und bei 34 % eine verminderte Expression dokumentiert werden. Die Analyse der Transkriptions-Muster von Tieren mit kalorienreduzierter Diät deutet darauf hin, dass die KR den Alterungsprozess über eine Modifikation des Stoffwechsels im Sinne eines erhöhten Proteinumsatzes und einer Verminderung von Schädigungen auf molekularer Ebene verlangsamt [128].

Ob die KR aber auch beim Menschen einen deutlichen lebensverlängernden Effekt hat, ist umstritten und wird wohl nie sicher abschließend beantwortet werden, da derartige Untersuchungen am Menschen kaum möglich sein dürften. Eine retrospektive Studie untersuchte unter anderem die Ernährungsgewohnheiten einer Population mit außergewöhnlich vielen über 100-Jährigen auf Okinawa. Deren Ergebnisse sprechen für ähnliche positive Effekte der KR beim Menschen, wie sie bereits aus Tiermodellen bekannt sind [129, 130]. Erste Ergebnisse derzeit noch laufender Studien mit Rhesus-Affen sprechen ebenfalls für eine Verlangsamung der Alterung durch KR bei Nicht-Menschenaffen [131, 132].

### 1.4.4 Antioxidantien

Die Datenlage hinsichtlich einer möglichen Verlängerung der Überlebensdauer durch eine Nahrungsergänzung mit Antioxidantien wie Vitaminen (E und C), Glutathion, Coenzym Q<sub>10</sub>, Melatonin und vielen weiteren ist widersprüchlich. Bei der Maus scheint, wie auch bei der KR, der Zeitpunkt des Beginns der antioxidativen Diät von Bedeutung zu sein. Mäuse, denen ab einem mittleren Lebensalter von 14–18 Monaten ein Antioxidans gefüttert wurde, wiesen keine Erhöhung der Überlebenszeit verglichen mit Kontrolltieren auf [133, 134, 135]. Für einen früheren Beginn der Gabe von Antioxidantien liegen Beobachtungen einer verlängerten maximalen Lebensdauer vor [136, 137], es existieren aber auch gegenteilige Studien [138]. Auch für die Regulation diverser Gene wurden differierende Ergebnisse publiziert. Zusammenfassend ist die Datenlage hinsichtlich eines positiven Effekts durch die langfristige Gabe von Antioxidantien sehr schwach und eventuelle positive Ergebnisse sind nur schwer reproduzierbar.

Im Rahmen der CreaLife-Studie konnte erstmals eine signifikante Verlängerung der mittleren und maximalen Lebensdauer durch eine langfristige Nahrungsergänzung mit Kreatin bei C57/Bl6-Mäusen nachgewiesen werden. Kreatin kann per se nicht als Antioxidans bezeichnet werden und auch die beobachteten Veränderungen der Expression legen einen

## 1.4 Möglichkeiten der Lebensverlängerung

anderen Wirkmechanismus als den bislang beschriebener Antioxidantien nahe [60].

### 1.4.5 Genetische Manipulationen

Vieles weist darauf hin, dass die Lebensdauer vieler Spezies genetisch determiniert ist, auch wenn der Grad der Vererbung nur ungefähr 35 % beträgt [139]. In zahlreichen Studien wurde jedoch ein deutlicher Einfluss von genetischen Veränderungen auf die mittlere und maximale Überlebensdauer beschrieben. Die betroffenen Gene hängen meist mit der Resistenz gegenüber Stress, der Regulation von Stoffwechsel und Genen, sowie der Stabilität des Genoms zusammen [140]. Für Nematoden wurden bereits Mitte der 90er Jahre diverse, den Alterungsprozess beeinflussende Gene beschrieben [141]. Die Untersuchung langlebiger Mutanten trägt viel zum Verständnis des Phänomens Altern bei, auch unter einem evolutionsbiologischen Gesichtspunkt. Wenn zum Beispiel eine loss-of-function Mutation in einem einzigen Gen zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt [142], so impliziert dies für die normale Aktivität des Gens negative Konsequenzen für die Lebensdauer. In Übereinstimmung mit der Theorie über die entgegenwirkende Pleiotropie (siehe 1.2.1) erfahren Gene, die die Fortpflanzung fördern, eine positive Selektion, selbst wenn sie letztendlich die Lebensspanne des Individuums limitieren.

Auch wenn die Existenz lebensverlängernder Mutationen als wahrscheinlich galt, waren deren massive Auswirkungen auf die Lebensdauer zunächst nicht absehbar. Als Beispiel kann man die mehr als zweifache Erhöhung der Überlebenszeit durch Mutationen in *daf-2* oder *isp-1* Genen bei *Caenorhabditis elegans* anführen [143, 144]. Durch Kombination mit weiteren Mutationen wie *clk-1* konnte die Lebensdauer von *daf-2 clk-1* Doppel-Mutanten nochmals verdoppelt werden [145]. Diese enormen Steigerungen der Lebensdauer können nicht durch die Verzögerung einzelner, spezies-spezifischer Pathologien erklärt werden. Vielmehr ist eine Beeinflussung grundlegender Alterungsmechanismen anzunehmen [146]. Gleiches gilt auch für lebensverlängernde Mutationen in Säugern, auch wenn die erzielten Steigerungen der Lebensdauer (bis 50 %) nicht so beeindruckend wie bei Nematoden ausfielen [147, 148, 149, 150, 151, 63]. Ob der 25fache Unterschied in der maximalen Lebensdauer von Nagern und Menschen durch einige wenige Gene bestimmt wird, ist fraglich [152, 153, 29]. Die Erforschung langlebiger Mutanten trägt viel zur Aufdeckung molekularer Mechanismen des Alterns bei. So könnten dann pharmakologische Angriffspunkte für Mimetika der Mutationen, die später auch beim Menschen einsetzbar wären, identifiziert werden [146].

## 1.5 Strukturen auf makroskopischer, mikroskopischer und molekularer Ebene mit besonderer Relevanz für den Alterungsprozess und die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen

### 1.5.1 Der Hippocampus

Anatomischer Fokus dieser Arbeit ist der Hippocampus, der ein wichtiger Teil des limbischen Systems ist. Er hat besondere Bedeutung für Lernvorgänge (Gedächtnisbildung), Aggression, Motivationsverhalten und Bewusstsein. Über zahlreiche Afferenzen erhält er unter anderem somatische, olfaktorische, visuelle, auditorische und motorische Informationen und spielt in der Pathogenese diverser Erkrankungen eine wichtige Rolle [154]. Gegenüber neurodegenerativen und altersassoziierten Prozessen scheint er besonders vulnerabel zu sein [155].

**Makroskopische Anatomie** Der Hippocampus ist Hauptbestandteil des Archikortex und ist zum größten Teil im Temporallappen an der medialen Seitenwand des Seitenventrikelunterhorns lokalisiert. Sein Endstück bildet die *Pes hippocampi*, nach hinten oben reicht er bis zum kaudalen Ende des Corpus callosum und setzt sich dort in die Faserstruktur des Fornix fort, welcher in den Corpora mamillaria endet.

**Funktionelle Verknüpfungen mit anderen Hirnstrukturen** Der Hippocampus erhält zahlreiche *Afferenzen* aus der medial von ihm gelegenen Regio entorhinalis, über welche ihm Impulse aus dem Riechhirn, dem Corpus amygdaloideum und dem Neokortex übermittelt werden. Auf diese Weise erreichen ihn somatische, olfaktorische, visuelle, auditorische und motorische Informationen in modulierter Form, die alle im Gyrus parahippocampalis konvergieren. Weiterhin erhält er afferente Fasern aus dem Thalamus, Gyrus cinguli und dem Septum über den Fornix.

Der Tractus perforans aus der Regio entorhinalis endet an den Dendriten der Körnerzellen im Stratum moleculare der Fascia dentata. Die Axone der Körnerzellen, auch Moosfasern genannt, treffen die Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region im Stratum lucidum. Die den Hippocampus verlassenden Axone der Pyramidenzellen der Region CA3 geben Schaffer-Kollaterale an die Pyramidenzellen der CA1-Region ab (siehe Abbildung 1.3). Die Pyramidenzellen der CA1-Region zeichnen sich durch das Phänomen der Langzeitpotenzierung aus, welches mit der Gedächtnisfunktion des Hippocampus in Zusammenhang gebracht wird.

Die meisten *Efferenzen* des Hippocampus verlaufen im Fornix, welcher Faserzüge an das Septum, Corpus amygdaloideum und Hypothalamus abgibt und mit dem größten Teil seiner Fasern in den Corpora mamillaria endet. Dabei entstehen Teile des nach Papez benannten Neuronenkreises [154].

## Histologie des Hippocampus

Durch die eingerollte Struktur des Archikortex erinnert der Hippocampus im Querschnitt an das *Ammonshorn* (Cornu ammonis). Charakteristisch ist der Aufbau aus drei Hauptschichten, der im Gegensatz zu dem sechsschichtigen Aufbau des Neokortex steht.

Oberflächlich findet man eine *Faserschicht* (*Alveus*; 9), gefolgt von einer *Korbzellschicht* (*Stratum oriens*; 2) und der großzelligen *Pyramidenzellschicht* (*Stratum pyramidale*; 3) mit glutamatergen Neuronen. Es schließt sich das *Stratum radiatum* (4), ein *Stratum lacunosum* (5) und zuletzt die zellarme Schicht des *Stratum moleculare* (6) an, die der interneuronalen Verschaltung zwischen Pyramiden- und anderen Zellen dient. Wie in anderen Hirnregionen bilden die großen Pyramidenzellen mit ihren langen Axonen das efferente System des Hippocampus.

Histomorphologisch kann man das Cornu ammonis in die Felder CA1–CA4 einteilen (vergleiche Abbildung 1.3).

**Altersassoziierte Veränderungen** Mit dem Alterungsprozess assoziierte Veränderungen im Hippocampus wurden mit diversen Methoden identifiziert. Beschrieben wurde eine Abnahme der Zellzahl [156] und der Synapsen [157], intrazelluläre Pathologien und eine ausgeprägte Affinität dieser Region zu neurofibrillären Ablagerungen.

Auch der mit dem Alter zunehmende Rückgang bestimmter kognitiver Fähigkeiten, welcher auch oft die Klinik neurodegenerativer Erkrankungen bestimmt, deutet auf eine ursächliche Beteiligung des Hippocampus hin. Über die zu Grunde liegenden morphologischen Veränderungen wird derzeit kontrovers diskutiert [155]. Gleiches gilt auch für die funktionelle Bedeutung der adulten Neurogenese, die möglicher Weise bei der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten von Bedeutung sein könnte.

### 1.5.2 Das Mitochondrium

**Funktion** Mitochondrien sind in nahezu allen Eukaryontenzellen vorhanden; in diesen von einer Doppelmembran umgebenen Organellen wird die Hauptmenge des Zell-ATPs produziert. Aus der Verbrennung von Kohlenhydraten und Fettsäuren werden einfache Energieträger wie NADH und FADH<sub>2</sub> gewonnen, anschließend wird in diversen Reaktionsschritten der Atmungskette ADP in energiereiches ATP umgewandelt. Neben ihrer Funktion als “Kraftwerk“ der Zelle spielen sie unter anderem in der Induktion der Apoptose, in der Synthese von Steroidhormonen und Eisen-Schwefel-Clustern, der Calcium-Homöostase und wichtigen Stoffwechselwegen wie dem Zitratzyklus eine essentielle Rolle [158].

Wegen der grundlegenden Funktion des Mitochondriums im Energiehaushalt der Zelle und der Generation freier Radikale in der Atmungskette, steht seine Dysfunktion im Zusammenhang mit der Pathogenese eines breiteren Spektrums an Erkrankungen als lange angenommen. Prädestiniert sind vor allem Gewebe mit einem hohen Energiebedarf, wie beispielsweise Muskulatur, Retina und ZNS. Insbesondere bei neurodegenerativen Mechanismen scheint das Mitochondrium eine herausragende Stellung einzunehmen (siehe auch 1.7.3 ff) [159].

## 1.5 Strukturen mit besonderer Relevanz für den Alterungsprozess

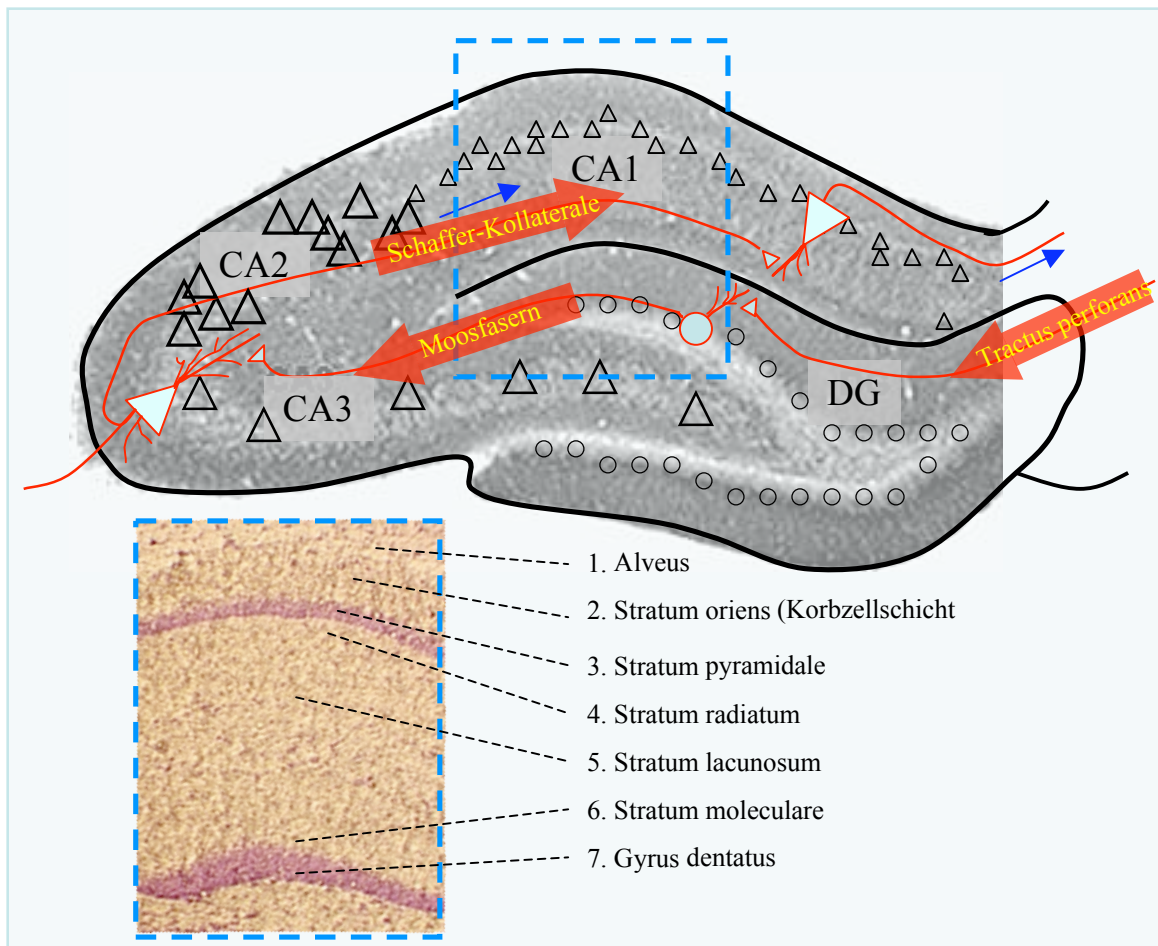


Abbildung 1.3: Histologisch kann man vier Felder unterscheiden: Das CA1-Feld enthält viele kleine Pyramidenzellen, das CA2-Feld zeichnet sich durch besonders große Pyramidenzellen aus, die im CA3-Feld etwas lockerer angeordnet sind. Das Ammonshorn endet in der aufgelockerten Struktur des CA4-Felds, welches von den Neuronen des Gyrus dentatus (DG; 7), die ein dichtes Zellband bilden, umrundet wird. *Histologie des Hippocampus*: (1) Alveus, (2) Stratum oriens (Korbzellschicht), (3) Stratum pyramidale (Pyramidenzellschicht), (4) Stratum radiatum, (5) Stratum lacunosum, (6) Stratum moleculare [154].

## 1.5 Strukturen mit besonderer Relevanz für den Alterungsprozess

**Die mitochondriale DNA (mtDNA)** Jedes Mitochondrium enthält zahlreiche Kopien seines eigenen mitochondrialen Genoms, beim Menschen ist es 16,569 kb lang und liegt doppelsträngig in zirkulärer Form vor. Die insgesamt 37 aufeinander folgenden Gene, welche 22 tRNAs, 13 Polypeptide der Atmungskette und 2 rRNAs kodieren, besitzen keine Introns. Die restlichen Proteine der Atmungskette werden von Genen der nDNA kodiert, ihre Translation erfolgt im Zytosol, anschließend werden sie in die Mitochondrien importiert [160].

Die mtDNA wird maternal vererbt - einige wenige Ausnahmen wurden beschrieben [161] - und ist im Vergleich zur nDNA empfindlicher gegenüber schädigenden Einflüssen, so auch dem altersassoziierten oxidativem Stress [162]. Einige gängige Ursachen für die erhöhte Vulnerabilität der mtDNA werden kurz beschrieben, man kann diese in Unterschiede in der Exposition und dem Schutz gegenüber ROS unterteilen.

**Mechanismen der Schädigung von mtDNA auf molekularer Ebene** Zwei wichtige Ursachen von Schäden in der mtDNA werden kurz erläutert:

1. Schädigung durch Chemikalien
2. Schädigung durch ROS

**Schädigung durch Chemikalien** Wegen dem Vorgang der oxidativen Phosphorylierung, welcher im Mitochondrium lokalisiert ist, findet man ein auf der Matrix-Seite negatives Membranpotential, was zur Folge hat, dass lipophile Kationen hier eine bis zu 1000fach höhere Konzentration aufweisen als in anderen Zellorganellen. Viele beim Menschen eingesetzte Pharmaka sind lipophile Kationen, welche als unerwünschte Nebenwirkung Mitochondriopathien auslösen können. Schädigende Chemikalien mit lipophilen Eigenschaften können durch ihre Konzentration im Mitochondrium dort zu einer vermehrten Schädigung der mtDNA führen.

**Schädigung durch ROS** Ein grundlegender Pathomechanismus ist die Schädigung der mtDNA durch freie ROS, deren Hauptquelle die Atmungskette der Mitochondrien ist. Die mtDNA ist nahe der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert, in welcher auch die Atmungskette verankert ist. Wegen dieser unmittelbaren räumlichen Nähe kommt es trotz dem Schutz durch diverse Antioxidantien zu einer Exposition gegenüber ROS. Folge ist die oxidative Schädigung der mtDNA und das Entstehen von Mutationen, begünstigt durch fehlende protektive Histone und im Vergleich zur nDNA weniger effiziente Reparatursysteme [160]. Daraus ergibt sich der *circulus vitiosus*, auf welchen bereits bei der Besprechung der mitochondrialen Theorie des Alterns (siehe 1.2.3) hingewiesen wurde.

**Altersassoziierte Veränderungen** Altersassoziierte Veränderungen in der Aktivität von Enzymen der Atmungskette wurden für unterschiedliche Gewebe und Spezies untersucht. Die meisten Arbeiten beschrieben eine Verminderung der Aktivität von Komplex I und weniger stark ausgeprägt von Komplex IV und eine weitgehend konstante Aktivität

## 1.5 Strukturen mit besonderer Relevanz für den Alterungsprozess

der Komplexe II und III. Diese Beobachtung ist äußerst interessant, da die Komplexe I und IV durch die mtDNA kodiert werden, während Komplex II ausschließlich durch nDNA kodiert wird [163].

Histochemische Untersuchungen wiesen eine mit dem Alter steigende Zahl COX-defizienter Zellen in diversen Organen nach [59].

Mitochondrien älterer Tiere produzieren deutlich mehr ROS als die jüngerer, was sowohl für Insekten, als auch für Säugetiere nachgewiesen werden konnte. Zudem kam es zu einem deutlichen Anstieg von Markern oxidativen Stresses und dem Verlust mehrfach ungesättigter Fettsäuren [163].

Als Folge oxidativer Schädigung kommt es zu einer exponentiellen Akkumulation von Punkt-Mutationen in der mtDNA mit dem Alter. Allerdings ist deren Zahl höchstwahrscheinlich niedriger als bislang angenommen und ihr Beitrag zum physiologischen Alterungsprozess fraglich [164, 73]. Bedeutsamer scheint die Zunahme von mehrere tausend Basenpaare umfassenden Deletionen - wie beispielsweise der "Common deletion" - zu sein [59, 73].

### Entstehung von ROS

Wie bereits erwähnt stützt sich die mitochondriale Theorie des Alterns auf die Beobachtung, dass mit zunehmendem Alter die Mitochondrienfunktion vieler Zellen eingeschränkt ist und vermehrt Mutationen der mtDNA auftreten (siehe Kapitel 1.2.3). Diese altersassoziierte Beeinträchtigung von Enzymen der Atmungskette hat nicht nur eine verminderte ATP-Synthese zur Folge, sondern wegen Elektronen-Lecks in der Atmungskette auch eine erhöhte Bildung von ROS [160]. Des Weiteren werden Enzyme zum Schutz vor freien Radikalen mit zunehmendem Alter zum Teil vermindert exprimiert.

Eine Zelle ist oxidativem Stress ausgesetzt, wenn entweder die anti-oxidativen Schutzmechanismen defekt oder nicht ausreichend sind, oder aber eine exzessive Produktion von ROS vorhanden ist. Bei dem Prozess des Alterns scheint beides der Fall zu sein und sich gegenseitig zu verstärken. ROS scheinen zudem eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Signalwegen spielen, welche zur Zell-Apoptose führen [165].

Vom Gesamtsauerstoffverbrauch der Zelle entfallen ca. 10-15 % auf nicht-mitochondriale Reaktionen, ein kleiner Teil der freien Radikale fallen also auch außerhalb des Mitochondriums an. Benötigt wird der Sauerstoff von diversen Oxidasen und Oxygenasen und für direkte, nicht enzymatische Reaktionen. Man geht aber davon aus, dass die mit diesen Reaktionen konkurrierende Produktion von ROS niedriger ist als in den Mitochondrien, da die Sauerstoff-Affinität der im Cytosol lokalisierten Enzyme niedriger ist als die der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase [166].

Beispiele für die außerhalb der Mitochondrien stattfindende Generation von ROS sind die D-amino-Oxidase, Xanthin Oxidase, Cytochrom P450 und die Prolin- und Lysin-Hydroxylase.

85-90 % des in der Zelle vorhandenen Sauerstoffs werden in den Mitochondrien zur oxidativen Phosphorylierung verbraucht, bei welcher durch Oxidation ATP gewonnen wird. Schätzungsweise 0.2-2 % des von der Zelle aufgenommenen Sauerstoffs werden in den Mit-



### 1.5 Strukturen mit besonderer Relevanz für den Alterungsprozess

ochondrien zu ROS umgewandelt, meist in Superoxid-Anionen [167]. Da innerhalb des Mitochondriums die Atmungskette Hauptquelle für ROS ist, wird deren Funktion kurz erläutert.

**Die Atmungskette** Die Atmungskette verknüpft die Oxidation von Substraten im Cytoplasma und der mitochondrialen Matrix mit der ATP-Synthese.

Aus der Oxidation des Substrates werden Reduktions-Äquivalente gewonnen, welche entlang einer Kette aus Proteinen ("Atmungskette") übertragen werden, die Protonen in den Intermembranraum pumpt. Der aufgebaute Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Produktion von ATP genutzt. Preis für die Gewinnung von ATP mit Hilfe oxidativer Phosphorylierung ist das Entstehen von potentiell schädlichen ROS.

Die verschiedenen Strukturen der Atmungskette waren Gegenstand zahlreicher Studien, neuere Ergebnisse zeigen, dass die meisten ROS am Komplex I und Komplex III anfallen. Der Anteil dieser beiden Komplexe an der ROS-Erzeugung scheint vom Gewebe und der Versuchsanordnung abhängig zu sein und zwischen unterschiedlichen Spezies zu variieren. Am Komplex I, der Coenzym Q Reduktase, sind die Eisen-Sulphur-Zentren oder das Aktive-Seite-Flavin der Ort der ROS-Entstehung [162]. Am Komplex III (bc1 Komplex), ist es auf Grund von Inhibitor-Experimenten sehr wahrscheinlich, dass instabile Ubisemiquinone am Komplex 0 die Hauptquelle freier Radikale sind und nicht das Cytochrom b. Die Produktion von Superoxiden am Komplex I findet auf der Matrix-Seite der inneren Mitochondrienmembran statt, da die oben genannten Quellen von Superoxiden dort lokalisiert sind. Beim Komplex III wurde zunächst angenommen, dass die Superoxide auf der Matrix-Seite der Membran freigesetzt werden. Darstellungen des Komplexes III mit Röntgenstrahlen wiesen jedoch darauf hin, dass die Produktionszentren von Superoxiden dem Intermembranspalt zugewandt sind, Superoxide also auch in denselben freigesetzt werden. Weitere Studien konnten zeigen, dass die am Komplex III erzeugten Superoxide sowohl auf der Cytosol-Seite als auch der Matrix-Seite der Mitochondrien freigesetzt werden und zwar zu ca. 80 % in die Matrix und zu 20 % in den Intermembranraum [167].

**Beeinflussung der Superoxid-Bildung durch die metabolische Aktivität** Der metabolische Status der Zelle hat deutlichen Einfluss auf die Produktion freier Radikale. Diese ist im Stadium IV am höchsten, wenn die Atmungskette in reduziertem Zustand vorliegt, der Bedarf an ATP und somit die Aufnahme von Sauerstoff gering und der Protonengradient hoch ist. Seit über 30 Jahren ist bekannt, dass eine Überführung des metabolischen Status von Stadium IV in III durch Zugabe von ADP ein vermindertes Anfallen von ROS bewirkt. Das Entstehen freier Radikale hängt also nicht direkt von der aufgenommenen Sauerstoffmenge ab, sondern vielmehr von der Verfügbarkeit von ADP bzw. der Relation von ATP zu ADP [167]. Ein postulierter Wirkmechanismus von Kreatin setzt hier an (vergleiche Kapitel 1.7.2).

### 1.6 Lipofuszin

Lipofuszin ist ein sehr konsistenter Marker für den Alterungsprozess der Zelle in fast allen Lebewesen und korreliert negativ mit der Lebensdauer [168]. Das auch als "Alterungspigment" bekannte Lipofuszin ist eine intralysosomale, polymere Substanz, welche weder von Hydroxylasen degradiert, noch durch Exozytose aus der Zelle ausgeschieden werden kann. Lipofuszin entsteht durch die Autophagozytose oxidierter Zellbestandteile bzw. Zellorganellen. Mit zunehmendem Alter akkumuliert es in postmitotischen Zellen wie beispielsweise Kardiomyozyten und Neuronen. Dieses Phänomen wurde bereits vor über 100 Jahren beschrieben, aber erst in den letzten Jahren schenkte man möglichen Zusammenhängen von Lipofuszin-Akkumulation und zellulärer Dysfunktion mehr Aufmerksamkeit. Von einer alters- und Lipofuszin-assoziierten Dysfunktion sind vor allem nicht proliferierende Gewebe betroffen, denn die Zellteilung ist der einzig mögliche Weg, den Anteil von Lipofuszin am Gesamtzellvolumen durch simple Verdünnung zu verringern [169].

**Zusammensetzung und Eigenschaften** Hauptbestandteile von Lipofuszin sind Aggregate aus oxidativ modifizierten Proteinen (30–58 %) und degradierten Lipiden (19–51 %) [170]. Die Überreste der Proteine enthalten einen variablen Anteil an Aminosäuren, die Lipid-Komponente setzt sich hauptsächlich aus Triglyceriden, freien Fettsäuren, Cholesterin und Phospholipiden zusammen. Metalle wie Fe, Cu, Al, Zn, Ca und Mn machen weniger als 2 % aus, auch das Auftreten von Kohlenhydraten wurde beschrieben. Die Zusammensetzung von Lipofuszin kann je nach untersuchtem Gewebe und Alter variieren, allerdings ist es immer unlöslich und nicht weiter degradierbar, was unter anderem auf die Quervernetzung von Peptiden durch Aldehyde zurückzuführen ist.

Lipofuszin kann mit einer Reihe histochemischer Methoden nachgewiesen werden, etwa mit Färbungen für Lipide oder Kohlenhydrate (Sudan-Black, Ziehl-Neelsen etc.).

Der sicherste Nachweis von Lipofuszin gelingt über seine spezifische Autofluoreszenz. Deren Ursprung wurde noch nicht abschließend geklärt, höchst wahrscheinlich kommt sie aber durch Schiffische Basen zu stande, welche aus der Reaktion von Carbonyl- mit Aminogruppen entstehen. Das typische Emissionsspektrum von Lipofuszin hat eine Wellenlänge von 570–605 nm, wenn es mit einer Wellenlänge von 366–420 nm angeregt wird [169, 171].

**Entstehung von Lipofuszin** Die Zelle ist einem stetigen Prozess der Selbsterneuerung unterworfen, bei welchem Makromoleküle und Organellen in ihre niedermolekularen Grundbestandteile aufgelöst werden. Die Degradierung findet in unterschiedlichen Systemen wie beispielsweise Proteasomen und Lysosomen statt. Letztere sind für die Aufspaltung von langlebigen Proteinen und ganzen Organellen verantwortlich. Die durch Makroautophagozytose, Mikroautophagozytose und Chaperone-vermittelte Autophagozytose aufgenommenen Substanzen werden in Aminosäuren, Fettsäuren und einfache Zucker zerlegt und für anabole Vorgänge zur Verfügung gestellt. Viele der aufgenommenen Substanzen können aber nicht vollständig abgebaut werden, ein Manko, welches in der Produktion von Lipofuszin resultiert [171].

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

Die Entstehung von Lipofuszin wird zudem durch aufgenommene Mediatoren oxidativen Stresses, beispielsweise  $Fe^{3+}$  aus Metallo-Proteinen, begünstigt. Hierbei scheint die Quervernetzung von Proteinen durch entstandene Agenzien wie Aldehyde (4-Hydroxynonenal) von besonderer Bedeutung zu sein [169].

Für eine Interaktion zwischen oxidativem Stress und der Formation von Lipofuszin scheinen auch Versuche zu sprechen, bei denen unter einer vermehrten Exposition gegenüber Sauerstoffradikalen eine gesteigerte Produktion von Lipofuszin beobachtet wurde [172]. Die Zusammenhänge sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

**Einfluss von Lipofuszin auf die Funktion der Zelle** Die Funktion der o.g. Abbau-systeme ist die Elimination dysfunktionaler Proteine und Organellen aus dem Zytosol. Die Kapazität dieser Systeme nimmt in postmitotischen Zellen mit zunehmendem Alter oder oxidativem Stress ab. Geschädigte Zellbestandteile werden folglich nicht sofort abgebaut sondern weiterhin oxidiert, was die vermehrte Akkumulation von Lipofuszin begünstigt. Lipofuszin ist keine inerte Substanz, es besitzt eine redox-aktive Oberfläche und kann zu Störungen diverser Funktionen der Zelle führen. Grund für seine Toxizität ist die Bindung von Metallen, welche über Metallo-Proteine aufgenommen werden und die Fenton-Reaktion katalysieren. Lipofuszin kann also die eigene Entstehung begünstigen [171].

Ein wichtiger Effekt der intralysosomalen Akkumulation von Lipofuszin ist der nutzlose Verbrauch dringend benötigter lysosomaler Enzyme. Diese werden in Vesikeln von der trans-Seite des Golgi Apparates zu den Lysosomen transportiert, in dem vergeblichen Versuch das enthaltene Lipofuszin abzubauen und stehen für existentielle zelluläre Prozesse wie den Abbau dysfunktionaler Organellen nicht mehr zur Verfügung.

Außerdem führt Lipofuszin über eine Inhibition von Proteasomen zu einer direkten Verminderung der Proteolyse [169].

Lipofuszin kann in Motorneuronen von alten Menschen bis zu 75% des Zellvolumens ausfüllen - eine Reduktion der funktionellen Kapazität und letztlich die Induktion der Apoptose können die Folge sein. Zudem erhöht Lipofuszin die Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress.

In Neuronen der Retina kann Lipofuszin in Interaktion mit blauem Licht als Photosensitizer fungieren. Im Einklang mit der stark ansteigenden Inzidenz der Makulardegeneration mit dem Alter wurde das vermehrte Auftreten von Deletionen beschrieben [173, 174].

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

Kreatin ist eine körpereigene Verbindung und spielt im Energiestoffwechsel der Zelle eine bedeutende Rolle. Die höchsten Konzentrationen finden sich folglich in Geweben mit einem hohen Energiebedarf, wie beispielsweise der Herz- und Skelettmuskulatur und dem Gehirn. Kreatin ist als pulverförmiger Nahrungsmittelzusatzstoff frei verkäuflich und erfreut sich seit Anfang der 90er Jahre als Nahrungsergänzung zur körperlichen Leistungssteigerung wachsender Beliebtheit. In den letzten Jahren wurde verstärkt die potentielle klinische Anwendung von Kreatin bei diversen Krankheiten geprüft.

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

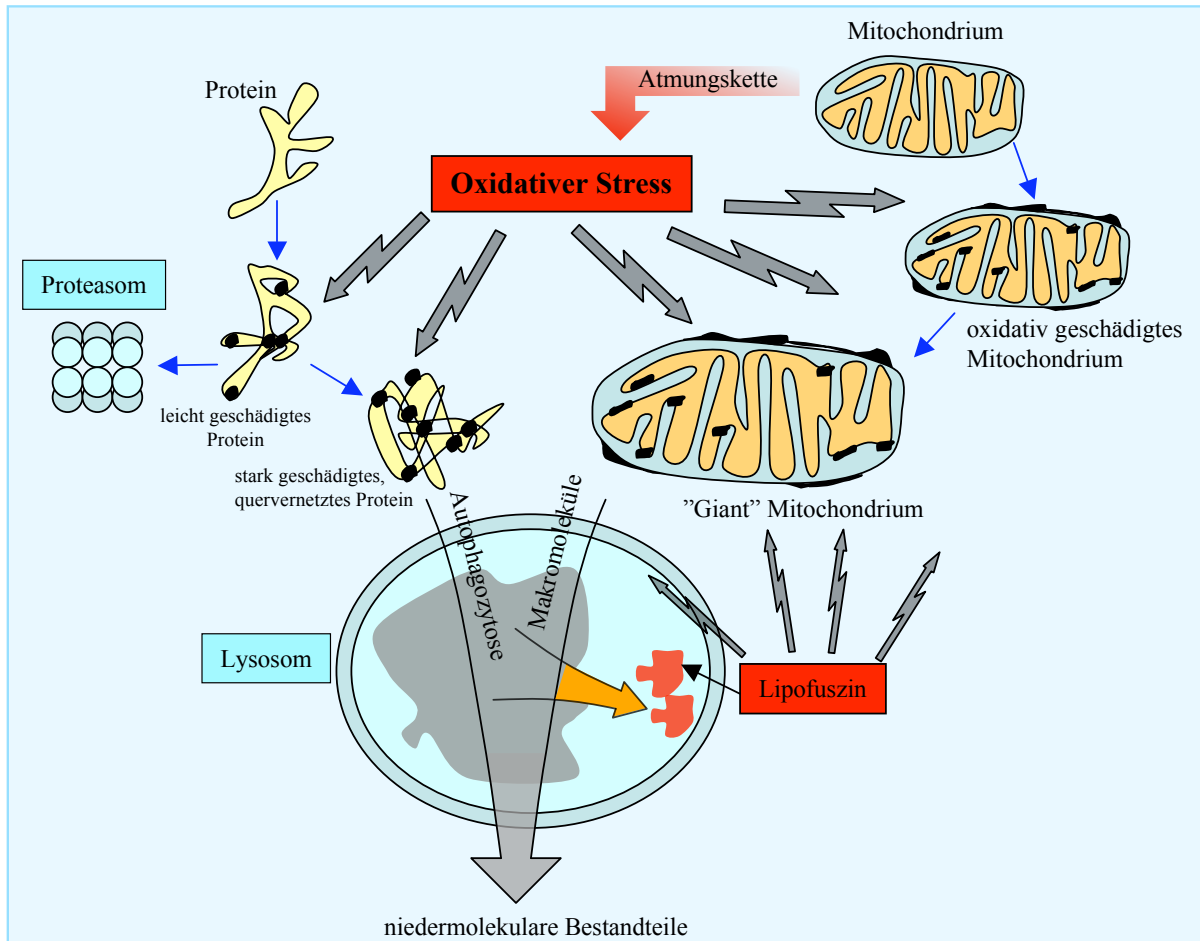


Abbildung 1.4: Darstellung möglicher Zusammenhänge der Lipofuszinogenese. Freie Radikale, deren Hauptquelle die mitochondriale Atmungskette ist, schädigen Zellorganellen und Proteine. Für diese existieren diverse Abbaumechanismen, u.a. Proteasomen und Lysosomen, von welchen sie autophagozytiert und in ihre niedermolekularen Bestandteile zerlegt werden. Die aufgenommenen Substanzen enthalten auch Mediatoren oxidativen Stresses, beispielsweise  $Fe^{3+}$  aus Metallo-Proteinen, welche zur Entstehung nicht degradierbarer Aggregate, dem Lipofuszin, führen. Dieses ist wiederum selbst Quelle von ROS.

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

### 1.7.1 Synthese und Abbau von Kreatin

**Bildung von Kreatin** Der größte Anteil an Kreatin befindet sich mit ca. 95 % in der Skelettmuskulatur [175], wo es zu ca. 40 % in freier (Kreatin) und ca. 60 % in phosphorylierter Form (Kreatinphosphat) vorliegt. Der Gesamt-Pool von Kreatin wird für eine 70 kg schwere Person auf 120–140 g geschätzt [176]. Kreatin wird zum einen endogen produziert (ca. 1 g/Tag), größtenteils in der Leber und Niere, zum anderen über exogene Quellen wie Fleisch und Fisch über den Verdauungstrakt resorbiert (ca. 1 g/Tag bei normaler Ernährung) [177]. Die endogene Biosynthese von Kreatin vollzieht sich in zwei Schritten: Zunächst wird die Guanidinogruppe von Arginin in einem reversiblen Schritt auf Glycin übertragen, das entstandene *Guanidinoacetat* wird anschließend mit *Adenosylmethionin* als Methylgruppendonator methyliert.

Die beiden an der Biosynthese von Kreatin beteiligten Enzyme, die *Transaminidase* und die *Transmethylase* kommen beim Menschen in Leber, Pankreas, Milz, proximalen Nierentubuli und im Gehirn vor. Der Kreatinstoffwechsel der Muskelzelle wird folglich durch die Aufnahme von Kreatin aus dem Blut bestimmt.

**Abbau von Kreatin** Kreatin wird als Kreatinin im Urin ausgeschieden. Aus Kreatinphosphat erfolgt unter Abspaltung eines anorganischen Phosphats der zur Kreatininbildung notwendige Ringschluss. Das gebildete Kreatinin wird in der Niere glomerulär filtriert und ausgeschieden [178].

### 1.7.2 Wirkmechanismen von Kreatin

Die Wirkung von Kreatin ist sehr komplex und umfasst neben zellulär vermittelten Mechanismen auch Veränderungen in der Expression von Genen und der Hämodynamik. Eine Gewichtung der unterschiedlichen Wirkmechanismen muss sicherlich immer auch im Hinblick auf den untersuchten Pathomechanismus bzw. das untersuchte Modell erfolgen.

#### Kreatin und der Energiestoffwechsel der Zelle – mögliche Wirkmechanismen

Da die ATP-Vorräte der Zelle begrenzt sind und die lokalen ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen sowie deren Relation zueinander an der Regulation des Zellmetabolismus beteiligt sind, wird Kreatinphosphat als Reservephosphat bzw. Energiespeicher benötigt [179]. Bei länger andauernder Arbeit können Energiereserven, die in Form von Glykogen und Triglyceriden gespeichert sind, mobilisiert werden. Zur schnellen Überbrückung von Energieengpässen dient die kontinuierliche Regeneration von ATP aus Kreatinphosphat. Der ATP-Gehalt in der Zelle bleibt somit konstant, während der Kreatinphosphatspiegel abfällt und der Gehalt an anorganischem Phosphat ansteigt.

Kreatinphosphat steht mit ATP über die *Kreatinkinase*reaktion in Beziehung.



## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

Das Gleichgewicht der Kreatinkinase-reaktion liegt im leicht sauren Cytosol ganz auf der Seite der ATP-Bildung. In der Zelle ist dadurch auch unter Belastung und bei Sauerstoffmangel ein konstanter ATP-Spiegel gewährleistet.

In der Erholungsphase erfolgt die Rephosphorylierung des Kreatins zu Kreatinphosphat. Diese Reaktion wird nicht von der cytosolischen, sondern von der an der Außenseite der Innenmembran lokalisierten mitochondrialen Kreatinkinase katalysiert. Dank der spezifischen Lokalisation ist eine rasche Kreatinphosphorylierung durch ATP aus der oxidativen Phosphorylierung sichergestellt [178]. Kreatin spielt eine wichtige stabilisierende Rolle im Zellstoffwechsel und dient sowohl als Energiespeicher, als auch als Energiestransporter zwischen den Mitochondrien und dem Ort des Endverbrauchs (siehe Abbildung 1.5). Neben

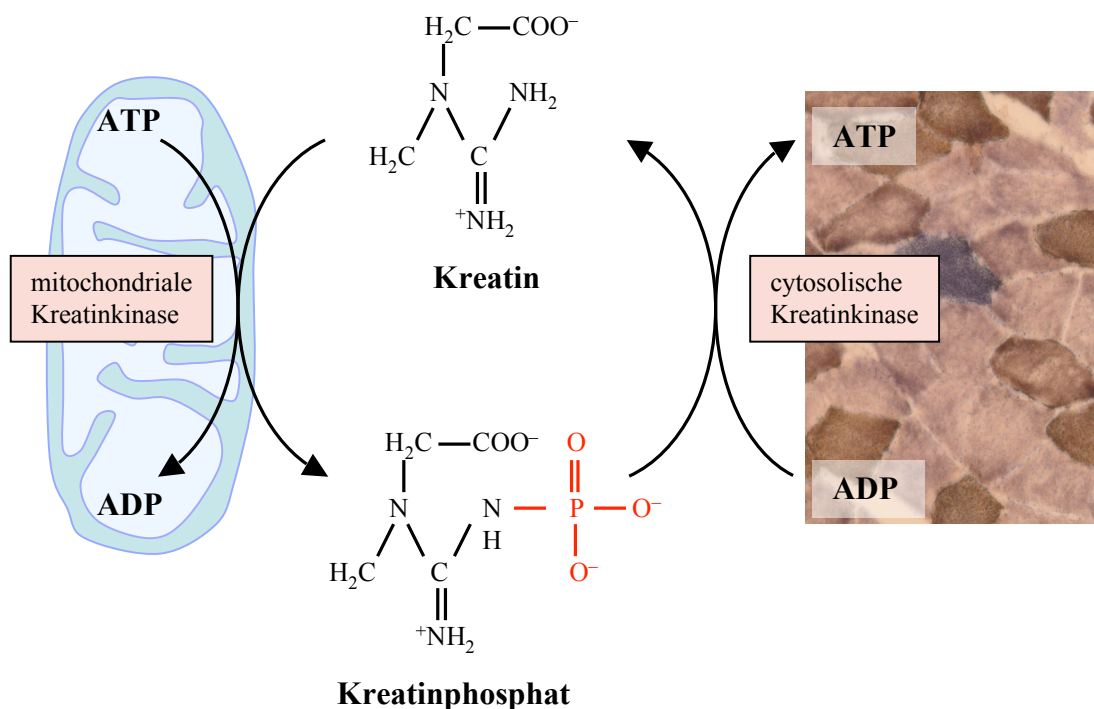


Abbildung 1.5: Regeneration von ATP durch Kreatinphosphat.

seiner stabilisierenden Wirkung auf den Energiehaushalt besitzt Kreatin möglicherweise auch eine wichtige Pufferfunktion in der Regulation des pH-Werts. Unter anaeroben Bedingungen (z.B. Training) bzw. einem sauren pH erfolgt eine verstärkte Generation von ATP, während der Regeneration wird wieder verstärkt Kreatinphosphat gebildet, welches wegen seiner stark negativen Ladung die Zellmembran nicht passieren kann [177]. Ein protektiver Effekt von exogenem Kreatin konnte in Zellkulturen nachgewiesen werden, in welchen eine Behandlung mit Kreatin zu einer längeren Aufrechterhaltung der zellulären Integrität nach anoxischer Schädigung führte [180, 181]. Zusammenfassend kann man von einem stabilisierenden Effekt des Kreatin/Kreatinphosphat-Systems auf den Energiehaus-

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

halt der Zelle sprechen.

Eine protektive Wirkung von Kreatin könnte – neben der o.g. Umwandlung in Kreatinphosphat – in der Bereitstellung von ADP durch die Kreatinkinase-Reaktion liegen. Das Ausmaß der Generation freier Radikale durch die Atmungskette (siehe Kapitel 1.5.2) hängt wesentlich von der Verfügbarkeit von ADP ab [182]. Ein Mangel an ADP kann zu einer Dysfunktion der Atmungskette im Sinne eines “Elektronenstaus“ führen und in einer gesteigerten Produktion toxischer Superoxidationen resultieren [183]. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch tierexperimentelle Befunde von Mäusen mit einer fehlenden Form des Transporter-Proteins Adenin-Nucleotid-Translokator, welches für den Austausch von ADP und ATP an der Mitochondrienmembran verantwortlich ist. Ergebnis war eine 8fache Erhöhung des oxidativ-toxisch wirksamen  $H_2O_2$ , was auf eine Dissoziation von  $O_2$ -Verbrauch und der Produktion von ATP aufgrund eines intramitochondrialen ADP-Mangels zurückgeführt werden könnte [184, 185].

Man muss in diesem Zusammenhang allerdings auch Untersuchungen erwähnen, nach denen hohe intrazelluläre ADP-Spiegel sowohl die für das Membranpotential wichtigen ATPasen, als auch die oxidative Phosphorylierung hemmen können [179]. Des Weiteren können hohe ADP-Spiegel über einen transmembranösen Verlust von Nucleotiden zu einem Substratmangel an der Atmungskette führen.

Abgesehen von einer ausreichenden Verfügbarkeit von ADP an der Atmungskette, könnte die exogene Zufuhr von Kreatin durch eine Beeinflussung der Relation von ATP und ADP zu einer “Ökonomisierung“ der Energiegewinnung in der Atmungskette der Mitochondrien führen. Oxidativ-toxischer Sauerstoffverbindungen, die wiederum eine Dysfunktion der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette zur Folge hätten, würden in geringerem Maße anfallen und das Vorhandensein von ATP, welches für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials durch die  $Na^+/K^+$ -Pumpe in ausreichendem Umfang zur Verfügung stehen muss, wäre gewährleistet. Anderenfalls könnte es via glutamaterger NMDA-Rezeptoraktivierung zu einem vermehrten Kalziumeinstrom in die Zelle kommen, dessen Folge eine vermehrte Produktion von ROS mit anschließendem Zelltod sein könnte [186, 187, 188]. Auch die Wiederaufnahme von Glutamat in Vesikel ist eine energieabhängiger Prozess, der einer exzitotoxischen Zellschädigung entgegenwirkt [189]. Vor diesem Hintergrund kann die intrazelluläre Entfernung von  $Ca^{2+}$  durch die energieabhängigen  $Ca^{2+}$ -ATPasen ebenfalls als neuroprotektiver Mechanismus gewertet werden.

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt von Kreatin auf zellulärer Ebene ist die enge Verknüpfung der mitochondrialen Isoform der Kreatinkinase mit der sogenannten “transition pore“, einem Protein, welches mit apoptotischen und nekrotischen Formen des Zelltodes in Zusammenhang gebracht wird [190, 191]. Die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Kreatinkinase ist mit der *transition pore* indirekt über eine Kontaktstelle zu Porin – der Durchtrittsstelle für Kreatin und Kreatinphosphat [179] – und zum Adenin-Nucleotid-Translokator Protein verbunden [192]. Ein möglicher Wirkmechanismus von Kreatin im Sinne einer Stabilisierung der *transition pore* wäre auch hier denkbar [193, 194].

Ein weiterer Mechanismus der Prävention von Zellschädigungen ist durch die spezifische Ladungsverteilung von Kreatin, insbesondere Kreatinphosphat, vorstellbar. Bedingt durch seine Eigenschaften als Zwitterion könnte Kreatinphosphat mit seinem negativ geladenen

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

Phosphat und seiner positiven Guanidino-Gruppen zu einer Stabilisierung der Zellmembran beitragen. Kreatinphosphat könnte eine Bindung mit Phospholipiden eingehen und über eine Herabsetzung der Membran-Fluidität den Verlust zytoplasmatischer Bestandteile, wie beispielsweise Enzymen (Kreatinkinase), vermindern [177].

### **Synthese von Proteinen**

Eine gewollte Wirkung der Supplementation mit Kreatin ist die Zunahme der fettfreien Körpermasse und Größe der Muskelzellen. Typischer Weise wird bei einer Einnahme von Kreatin von 20 g/Tag über 4–28 Tage eine Zunahme des Gesamtkörpergewichts um 1–2 kg beobachtet [177], welcher auf eine Erhöhung der fettfreien Körpermasse zurückzuführen ist [195]. Volek et al. beschrieben nach einem Widerstandstraining über 12 Wochen unter Kreatin-Gabe einen Zuwachs des Durchmessers von Typ I- und Typ II-Muskelfasern um 35 % [196]. Nach einer einjährigen Gabe von 1,5 g Kreatin pro Tag beobachteten Sipila et al. bei Patienten mit einer Gyrtatrophie der Retina ein Wachstum von Typ II-Fasern um 42 %, jedoch ohne körperliches Training [197].

Die Zunahme der Muskelmasse könnte sowohl auf eine gesteigerte Synthese von Proteinen, als auch auf einen verminderten Katabolismus derselben zurückgeführt werden. Allerdings lieferten Experimente mit Zellkulturen widersprüchliche Ergebnisse und die Rolle von Kreatin im Metabolismus von Proteinen, insbesondere von Aktin und Myosin, wird derzeit kontrovers diskutiert [177].

### **Beeinflussung der Hämodynamik durch Kreatin**

Die prophylaktische Gabe von Kreatin führt in Tiermodellen des ischämischen Hirninfarkts zu einer Reduktion des Infarktolumens um bis zu 56 % [198]. Diese wurden zunächst auf die oben besprochenen bioenergetischen Effekte von Kreatin zurückgeführt, aktuelle Ergebnisse weisen aber auf die entscheidende Bedeutung einer verbesserten postischämischen Perfusion hin. So wurde bei der Maus mittels MRT eine gesteigerte cerebrovaskuläre Durchblutung und durch ex vivo-Experimenten an vaskulären Komponenten eine erhöhte Reagibilität der Gefäße nach einer oralen Supplementation mit Kreatin nachgewiesen. Der neuroprotektive Effekt von Kreatin könnte also auch unabhängig vom Energiestatus der Zelle über eine verbesserte cerebrovaskuläre Funktion vermittelt werden [199].

### **Kreatin und die Expression von Genen**

Sowohl die langfristige Gabe, als auch eine relativ kurze Applikation von Kreatin initiieren eine signifikante Regulation von Genen, bei der Maus wie beim Menschen. Die orale Supplementation von Kreatin über einen Zeitraum von zehn Tagen führte zu einer vermehrten Expression von Genen, die beim Osmosensing, der Synthese von Proteinen und Glykogen, Differenzierung und Proliferation von Satelliten-Zellen, dem Überleben der Zelle, der Reparatur und Replikation von DNA, der Kontrolle der RNA-Transkription und Umbauvorgängen des Zytoskeletts eine Rolle spielen [200].

Die langfristige Gabe von Kreatin führte bei der Maus zu einer Regulation von Genen,



## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

die mit Verhalten, der Neurogenese, dem Energiestoffwechsel und der Proteinbiosynthese in Zusammenhang stehen. Hinsichtlich der beschriebenen Veränderungen unter kalorischer Restriktion fanden sich Überschneidungen. Für Gene, deren verstärkte Expression mit zunehmenden Alter bekannt ist, wurde teilweise eine inverse Regulation beobachtet [60].

### 1.7.3 Therapeutischer Gebrauch

#### Orale Kreatin-Supplementation

Über die Wirkung einer orale Supplementation mit Kreatin liegt eine Vielzahl klinischer Studien vor. Untersucht wurden neben Normalpersonen und Sportlern auch Patienten mit verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern. Die Wirkung der Nahrungsergänzung mit Kreatin wurde auch in zahlreichen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen untersucht.

Die Aufnahme von 20–30 g Kreatin/Tag führt nach wenigen Tagen zu einer messbaren Zunahme von Kreatin im menschlichen Muskel (über 20 %) [201]. Allerdings sprechen ca. 30 % der Bevölkerung nicht auf eine orale Gabe von Kreatin im Sinne einer erhöhten Konzentration von Kreatin und Kreatinphosphat in der Muskulatur an [201]. Ein weit verbreitetes Einnahme-Regime setzt sich aus einer “Loading-Phase“ von 20 g/Tag für 5–7 Tage und einer “Erhaltungs-Phase“ von 3–5 g/Tag für einen variablen Zeitraum (1 Woche bis mehrere Monate) zusammen [176]. In Studien an Tieren enthält die Nahrung meist 0,5–2 % Kreatin [60].

#### Kreatin und Leistungssteigerung

Die Einnahme von Kreatin ist die vielleicht am weitesten verbreitete Nahrungsergänzung. Sie wird hauptsächlich mit dem Ziel der Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit eingenommen. Wegen seiner nachgewiesenen positiven Effekte auf die Maximalkraft ist Kreatin vor allem in Sportarten verbreitet, welche wiederholte, kurze Kraftanstrengungen hoher Intensität erfordern. Positive Auswirkungen auf die Maximalkraft konnten unabhängig von Geschlecht und Alter beobachtet werden [176]. Zudem wurde eine Zunahme der fettfreien Körpermasse, des Faserquerschnittes von Muskelzellen und des Gehalts an kontraktilen Proteinen beschrieben [202]. Für die Steigerung der potentiellen Arbeitsleistung der Muskulatur werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht. Eine Rolle spielt sicherlich die Befähigung zu einem intensiveren Training, ermöglicht durch eine erhöhte Verfügbarkeit von ATP in Folge vermehrter Kreatinphosphat-Speicher, was in der Hypertrophie der Muskelzelle resultiert. Nach einer Analyse des Expressionsmusters post Kreatineinnahme scheinen aber auch bereits erwähnte Veränderungen der Gen-Expression, z.B. die Induktion anaboler Proteinkinasen, von Bedeutung zu sein [60, 200].

#### Kreatingabe bei neurologischen Erkrankungen

Neben seiner bioenergetischen Wirkung besitzt Kreatin *in vitro* und *in vivo* anti-apoptische [203], anti-excitotoxische [189, 204] und direkt anti-oxidative [205, 206] Eigenschaften

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

ten. Diese machten es, neben seiner herausragenden Stellung im Energiehaushalt, zu einer viel versprechenden Substanz für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Analog zum Alterungsprozess (siehe 1.2.3) scheint es auch in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Chorea Huntington eine enge Interaktion zwischen Beeinträchtigungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels und oxidativem Stress zu geben [59, 60]. In einer Anzahl von experimentellen Untersuchungen an Tieren konnte eine z.T. sehr ausgeprägte neuroprotektive Wirkung von Kreatin beobachtet werden. In der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen beim Menschen waren diese Effekte aber leider deutlich geringer ausgeprägt. Im Folgenden werden einige Ergebnisse zu Untersuchungen einer oralen Gabe von Kreatin bei Mensch und Tier kurz besprochen.

**Parkinson-Syndrom** Die systemische Gabe von 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) führt im Tiermodell der Maus über eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels zu einem Parkinson-Syndrom. MPTP wird von der *Monamin-Oxidase B* in 1-Methyl-4-Phenylpyridin ( $MPP^+$ ) umgewandelt, welches den Komplex I der Atmungskette hemmt. Ähnlich wie bei menschlichen Morbus Parkinson scheint auch in diesem Modell ein bioenergetischer Defekt vorzuliegen.

Durch die orale Supplementation von Kreatin wurde der Kreatin-Spiegel im Gehirn signifikant erhöht und ein  $MPP^+$ -induzierter Verlust dopaminerger Neurone konnte fast vollständig verhindert werden [205]. Ein derart überzeugender neuroprotektiver Effekt wurde in diesem Tiermodell bislang für keine andere Substanz beschrieben.

In einer ersten Pilotstudie beim Menschen machte sich die Gabe von Kreatin vor allem in einer Verbesserung der Stimmung und einer geringeren Dosis-Steigerung der benötigten dopaminergen Therapie bemerkbar [207]. Derzeit läuft in den USA eine Phase III-Studie für die Therapie des M. Parkinson mit Kreatin [208].

**Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)** Die Schädigung von Motor-Neuronen durch freie Radikale scheint in der Pathogenese der ALS ein wichtiger Faktor zu sein. In ungefähr 20 % der familiären und 5 % der sporadischen Form kann ein Defekt in dem für die *Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD-1)* kodierenden Gen nachgewiesen werden. Heute sind ungefähr 90 Mutationen beschrieben worden, die höchstwahrscheinlich über eine toxische Funktionszunahme ("gain of function") zu einem verstärkten Anfall von Superoxidanionen und einer resultierenden vermehrten oxidativen Schädigung der Zellen führen. Wegen ihrer hohen Stoffwechselaktivität sind Vorderhornzellen gegenüber einer oxidativen Schädigung besonders empfindlich [209].

Im Tiermodell der ALS, der transgenen SOD-mutanten Maus, konnte mit der Gabe von Kreatin eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit um bis zu 26 Tage erreicht werden; den bis dahin besten Effekt in diesem Modell hatte Riluzole mit 13 Tagen. In der neuropathologischen Untersuchung konnte in der behandelten Gruppe, anders als bei den Tieren der Kontrollgruppe, eine Protektion vor dem Verlust von Vorderhornzellen und Neuronen der Substantia nigra beobachtet werden [210].

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

In Studien beim Menschen konnte bislang kein signifikanter Effekt im Sinne einer positiven Beeinflussung klinischer Parameter nachgewiesen werden [211, 212].

**Chorea Huntington** Die Chorea Huntington weist zu 98 % eine Mutation im Huntingtin-Gen auf Chromosom 4 auf, welche möglicherweise über indirekte Störungen der Energieproduktion eine fortschreitende Degeneration vor allem der kleinen und mittelgroßen striatalen GABAergen Projektionsneurone verursacht.

Mit den reversiblen bzw. irreversiblen Inhibitoren des mitochondrialen Komplex II (Succinatdehydrogenase) Malonat und 3-Nitropropionsäure konnten im Tiermodell über eine Störung des Energiestoffwechsels Läsionen induziert werden, die denen von Patienten mit Chorea Huntington gleichen. Die Gabe von Kreatin führte zu einer deutlichen Verminderung der Läsionen und einem Rückgang von Markern oxidativen Stresses [213].

In einem anderen Modell, der transgenen R6/2 Maus, konnte unter einer 2 % Kreatindiät eine Zunahme der mittleren Überlebensdauer um 17,4 %, eine Reduktion von striataler Atrophie und striatalen Aggregaten und ein verzögertes Auftreten von Diabetes verzeichnet werden [214].

Diese Ergebnisse im Tiermodell konnten in klinischen Studien am Menschen leider nicht erzielt werden. Eine Besserung der klinischen Symptomatik wurde für eine orale Supplementation mit Kreatin bislang nicht beschrieben, allerdings eine Verminderung von potentiell excitotoxischem Glutamat [215, 204]

**Myopathien** Da eine progressive Muskelschwäche ein wichtiges Charakteristikum diverser hereditärer Muskelerkrankungen ist und Kreatin beim Gesunden zu einer Steigerung der Muskelkraft führt, war anzunehmen, dass Patienten von einer Kreatin-Supplementation profitieren können.

Nach einer Cochrane-Analyse der bestehenden Literatur [216] kann man folgende Ergebnisse zusammenfassen.

Eine kurz- bis mittelfristige Behandlung mit Kreatin erzielte in Patienten mit verschiedenen Formen der Muskeldystrophie bei guter Verträglichkeit eine Steigerung der Muskelkraft [217].

In der Behandlung metabolischer Myopathien konnte keine Erhöhung der Muskelkraft beobachtet werden [218], unter einer Hochdosistherapie mit bis zu 150 mg/kg/Tag kam es zu Muskelschmerzen [219].

**Weitere Anwendungsgebiete und Eigenschaften** Patienten mit autosomal rezessiv vererbten Kreatinmangel-Syndromen, welche durch Störungen der Synthese von Kreatin durch Defekte der *Guanidinoacetat-Methyltransferase* (GAMT) und der *Glycin-Amidino-transferase* (AGAT) verursacht werden und teilweise mit einer schweren Klinik assoziiert sind, scheinen von einer oralen Substitution mit Kreatin zu profitieren [220]. Unter der Gabe von Kreatin normalisierten sich bei Patienten mit einer GAMT-Defizienz pathologisch veränderte Laborparameter, die Anzahl epileptischer Anfälle und die Schwere von Bewegungsstörungen nahm deutlich ab. Bereits bestehende intellektuelle Beeinträchti-

## 1.7 Die Prüfsubstanz Kreatin

gungen bildeten sich allerdings nicht zurück [221].

In Zellkulturen wurde ein protektiver Effekt von Kreatin gegenüber der Toxizität von beta-Amyloid und Glutamat für Kulturen aus hippocampalen Neuronen beschrieben. Zusätzlich verbesserte Kreatin das Überleben und die Differenzierung GABAerger und dopaminerger Neurone aus menschlichen embryonalem Hirngewebe [222, 223].

Neben einer Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit älterer Menschen scheint sich Kreatin auch auf deren kognitiven Fähigkeiten positiv auszuwirken [224].

### 1.7.4 Negative Auswirkungen von Kreatin

In den zahlreichen publizierten Studien war Kreatin ausgezeichnet verträglich und es gab kaum Hinweise auf unerwünschte Nebenwirkungen. Eine Nebenwirkung der Kreatin-Supplementation ist die fast immer zu beobachtende Gewichtszunahme, welche in fast allen Studien ein signifikantes Niveau erreicht [200]. Ursachen könnten die Muskelhypertrophie oder eine vermehrte Wasserretention sein. Seltene Nebenwirkungen beinhalten Übelkeit, Diarrhoe, Muskelkrämpfe, sowie Muskel- und Sehnenzerrungen, wenn der muskuläre Kraftzuwachs zu schnell in übermäßigem Training mündet. Ein 24 jähriger Bodybuilder entwickelte unter der Einnahme verschiedener Anabolika, unter anderem Kreatin, ein akutes Nierenversagen [225], so dass Kreatin letztlich nicht als auslösendes Agens eingestuft werden kann. Auch kann man über die Sicherheit von Kreatin bei einer vorbestehenden Einschränkung der Nierenfunktion auf der Grundlage der heutigen Daten keine Aussagen treffen. Für ein junges, gesundes Kollektiv scheint aber auch die langfristige, niedrigdosierte (bis 5 g/Tag) Supplementation unbedenklich zu sein [226, 227]. Eine Studie mit einem älteren Patientenkollektiv konnte keine Beeinträchtigung der Nierenfunktion nachweisen [228].

### 1.7.5 Zusammenfassung

Das Kreatin/Kreatinphosphat-System spielt in der Energiehomöostase des Organismus eine wichtige stabilisierende Rolle, insbesondere in Muskulatur und Gehirn.

Im Rahmen des Elektronentransports durch die Enzymkomplexe der Atmungskette entstehen bereits unter physiologischen Bedingungen hochreagible oxidativ-toxische Sauerstoffverbindungen, die zu einer gravierenden Schädigung von Makromolekülen wie beispielsweise der mtDNA führen können. Dieser Pathomechanismus scheint nicht nur in der Ätiopathogenese unterschiedlicher neurodegenerativer “Alters-Erkrankungen“, sondern auch bei physiologischen Alterungsprozess wirksam zu sein. Die Produktion freier Radikale und der Energiestoffwechsel der Zelle stehen in enger Wechselbeziehung und können unter bestimmten Vorraussetzungen zu exzitotoxischer Zellschädigung und Apoptose bzw. Nekrose führen. Neben diversen o.g. Wirkmechanismen von Kreatin, scheint dessen exogene Zufuhr auch auf diese Interaktion protektiv einzuwirken.

In verschiedenen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen mit einer erhöhten Exposition gegenüber oxidativem Stress führt die orale Supplementation mit Kreatin zu einer signifikanten Neuroprotektion und einer zum Teil verlängerten Überlebensdauer. Verant-

## 1.8 Die “CreaLife“-Studie

wortliche Schutz- und Wirkmechanismen sind möglicherweise die zusätzliche Verfügbarkeit von ATP für ATPasen zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials, die Stabilisierung der mitochondrialen *transition pore* als Schutz vor dem Beginn der Apoptose-Kaskade, die Regulation diverser Gene und die günstige Veränderung des ADP/ATP-Quotienten als Grundlage für eine Verminderung der Radikalproduktion in der Atmungskette.

### 1.8 Die “CreaLife“-Studie

Da es vermehrt Hinweise darauf gibt, dass der physiologische Alterungsprozess und neurodegenerative Erkrankungen teilweise analoge Pathomechanismen aufweisen und Kreatin bei letzteren protektiv wirksam ist, lag die Frage nahe, ob eine langfristige prophylaktische Gabe von Kreatin im Tiermodell der Maus zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit gesunder Mäuse führen kann. Die Auswirkungen einer chronischen exogenen Zufuhr von Kreatin auf den zellulären Energiehaushalt und den Gesamtorganismus gesunder Tiere wurde bis dato noch nicht ausreichend untersucht.

#### 1.8.1 Methoden

Um diese Hypothese einer positiven Beeinflussung der Überlebensdauer gesunder Mäuse durch die Gabe von Kreatin zu prüfen, wurden von insgesamt  $n = 162$  weiblichen C57/BL6 Mäusen  $n = 81$  Tiere ab einem Alter von  $365 \pm 2$  Tagen mit einer äquikalorischen, 1 % Kreatin-Diät gefüttert.

Hauptzielgröße der CreaLife-Studie war das Alter der Tiere zum Zeitpunkt des natürlichen Todes bzw. die mittlere und maximale gesunde *Überlebenszeit*. Neben der Überlebenszeit wurde aber auch die Wirkung von Kreatin auf diverse weitere Parameter untersucht. Die *Phänotypisierung* beinhaltete neben der Durchführung des SHIRPA-Protokolls die Testung des *Verhaltens* der Tiere mit einem modifizierten “Hole Board Test“, mit der Rotarod-Analyse wurde die *Koordinationsfähigkeit* bestimmt und mit dem “Grip strength“-Test wurde die *Kraft* der Tiere quantifiziert. Um weitere Hinweise auf die Wirkmechanismen von Kreatin zu erhalten und detaillierte Aussagen über dessen Auswirkungen auf Neurodegeneration und Alterung machen zu können, wurden im Gehirn und der Muskulatur Biomarker für Alterung und oxidativen Stress analysiert. Diese morphologischen und biochemischen Untersuchungen beinhalteten die Messung von *8-OHdG* im Hirn-Homogenat, die *COX/SDH-Färbung* von Muskel- und Hirnkryoschnitten, das Etablieren einer IrtPCR sowie rtPCR zur Quantifizierung von *Deletionen* der mtDNA und die fluoreszenzmikroskopische Messung von *Lipofuszin* im Hippocampus. Da der Alterungsprozess und die Gabe von Kreatin mit Veränderungen in der Regulation von Genen assoziiert sind, wurde zusätzlich ein *Expressionsprofiling* von Hirnhemisphären durchgeführt.

## 1.8 Die "CreaLife"-Studie

### 1.8.2 Ergebnisse

Die mit einer oralen Supplementation von Kreatin assoziierten Veränderungen von Biomarkern für Alterung und Neurodegeneration sind Hauptbestandteil der vorliegenden Dissertation und werden in Kapitel 4.4 gesondert dargestellt. Um deren Interpretation im Gesamtkontext zu ermöglichen, folgt eine kurze Übersicht der anderen Teilergebnisse.

**Erhöhte Konzentration von Kreatin im Serum** Die erfolgreiche gastrointestinale Resorption von Kreatin wurde durch eine Bestimmung der Kreatinkonzentration im Serum überprüft. Diese ergab für die Tiere der Verumgruppe gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöhte Werte ( $245,5 \pm 184,5$  versus  $73,5 \pm 14,4 \mu\text{mol/l}$  in Kreatin- respektive Kontrolltieren;  $p = 0,003$ ).

**Überlebenszeit** Die durchschnittliche "gesunde" Überlebenszeit - das Alter mit welchem die Tiere als krank klassifiziert wurden - war in der mit Kreatin behandelten Gruppe ( $613 \pm 84$  Tage) verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppe ( $563 \pm 95$  Tage) signifikant erhöht. Dies entspricht einer Steigerung der Überlebensdauer um 9% ( $p = 0,05$ ; siehe Abbildung 1.6) Der Effekt auf die maximale Überlebenszeit war weniger stark ausgeprägt,

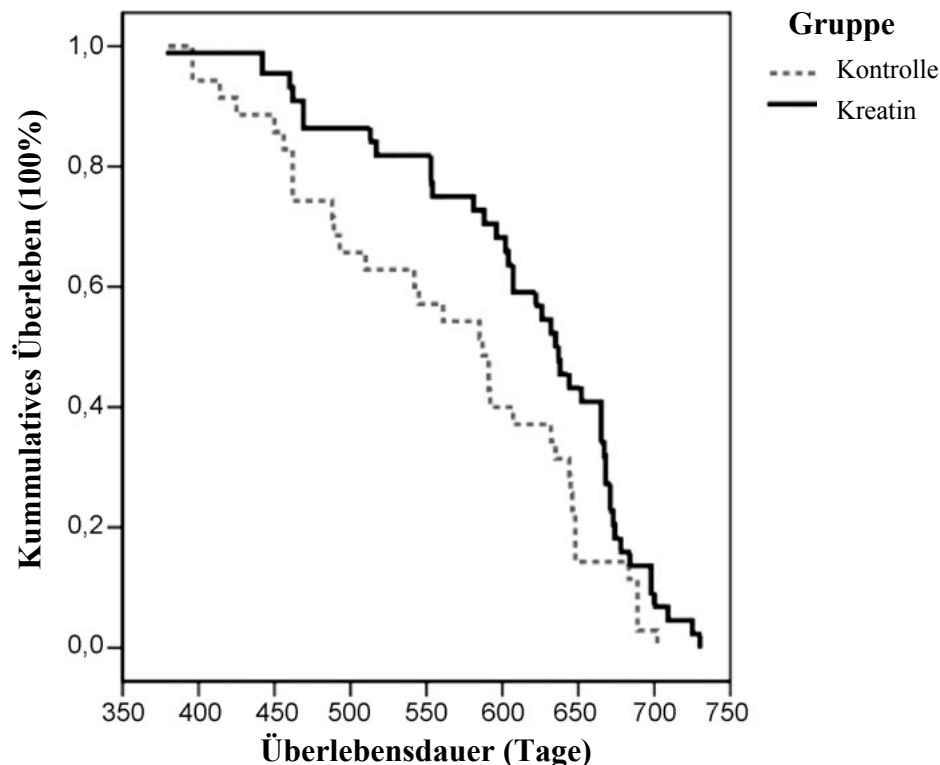


Abbildung 1.6: Kaplan-Meier Überlebenskurve für weibliche Mäuse, mit Standardfutter oder einer 1% Kreatin-Diät.

## 1.8 Die "CreaLife"-Studie

aber immer noch signifikant. Die ältesten 10 % der mit Kreatin behandelten Tiere erreichten ein Alter von  $716 \pm 14$  Tagen, die Tiere aus der Kontrollgruppe ein Alter von  $692 \pm 7$  Tage;  $p = 0,05$ .

Hinsichtlich der Inzidenz typischer Pathologien wie Neoplasmen, Nierenschäden und Dermatitis waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

**Phänotypisierung, Verhalten und Koordination** Während in Tests wie dem SHIRPA-Protokoll und der Rotarod- und Grip strength-Analyse keine Gruppendifferenzen beobachtet werden konnten, profitierten die Mäuse in den Kategorien Objektwiedererkennung ( $p < 0,05$ ; Abbildung 1.7A), explorativem Verhalten ( $p < 0,01$ ; Abbildung 1.7B) und Lokomotion ( $p = 0,054$ ; Abbildung 1.7C) von einer Supplementation mit Kreatin.

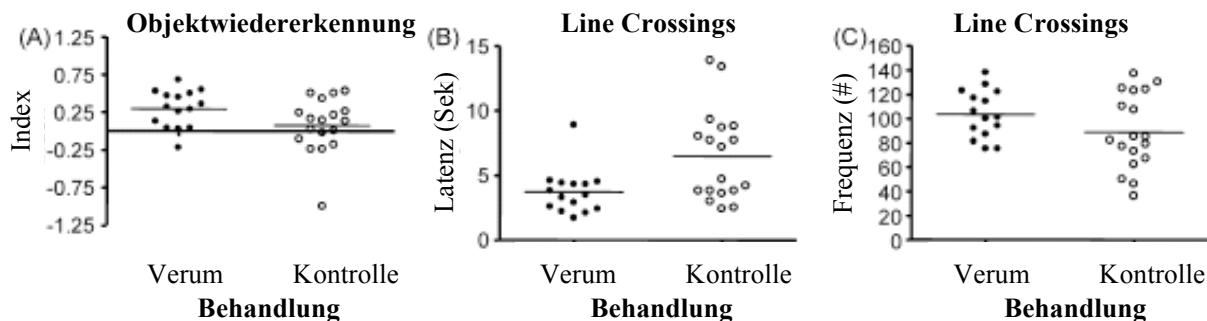


Abbildung 1.7: Mit Kreatin behandelte Mäuse zeichneten sich durch ein besseres Gedächtnis bei der Objektwiedererkennung ( $p < 0,05$ , A), eine geringere Latenz bis zum Beginn der Exploration eines neuen Umfeldes ( $p < 0,01$ , B) und einen Trend hin zu einer erhöhten lokomotorischen Aktivität ( $p = 0,054$ , C) aus.

**Expressionsprofil** In der Analyse der Expressionsmuster wurde die Regulation von Genen beobachtet, welche mit dem Verhalten, dem Energiestoffwechsel, der Neurogenese und der Proteinbiosynthese in Beziehung stehen. Teilweise gab es Überschneidungen mit Veränderungen, wie sie für Mäuse unter kalorischer Restriktion beschrieben wurden, beispielsweise Wachstumsfaktoren wie *Bdnf*, *Ndn*, *Hgf* und *Tgfb2* [128]. In Genen, für welche altersabhängige Veränderungen in der Expression beschrieben wurden [229], konnte in einigen Fällen bei den Tieren der Verumgruppe eine inverse Regulation beobachtet werden. Weitere unter Kreatingabe beobachtete Veränderungen legen eine Beeinflussung der Signalwege von Insulin, Hypoxie und der Schädigung von DNA nahe.

Weitere Details können in "Bender, A. et al., *Creatine improves health and survival of mice*, *Neurobiol Aging* (2007)" nachgelesen werden.

## 2 Eigene Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Kreatin spielt in der Energiehomöostase insbesondere von Muskelzellen und Neuronen eine herausragende Rolle. In der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen und dem physiologischen Alterungsprozess könnte es somit von grundlegender Bedeutung sein.

Neuroprotektive, antiapoptotische, antiexzitotoxische und direkt antioxidative Eigenschaften von Kreatin wurden bei neurodegenerativen Erkrankungen von Menschen und für deren Tiermodelle beschrieben. Im Rahmen der CreaLife-Studie konnte erstmals die lebensverlängernde Wirkung einer chronischen oralen Kreatin-Supplementation bei der gesunden Maus nachgewiesen werden.

Sowohl bei neurodegenerativen Prozessen, als auch dem physiologischen Alterungsprozess, scheint der durch ROS induzierte oxidative Stress von zentraler Bedeutung zu sein. Verschiedene postulierte Wirkmechanismen gehen von einer Modulation des oxidativen Stresses durch die Gabe von Kreatin aus.

Um mehr über die Wirkung von Kreatin auf Alterung und Neurodegeneration zu erfahren, mussten morphologische Korrelate zu Grunde liegender Pathomechanismen analysiert werden. Die untersuchten Biomarker für Alterung und oxidativen Stress wurden auch im Hinblick auf die funktionelle Relevanz für die Zelle ausgewählt.

Folgende Fragestellungen wurden vor diesem Hintergrund in der vorliegenden Arbeit bearbeitet.

1. Führt die langfristige orale Supplementation mit Kreatin bei der weiblichen C57/BL6 Maus als morphologisches Korrelat einer verlängerten Überlebensdauer zu Veränderungen in der Akkumulation von Lipofuszin als Biomarker für Alterung und oxidativen Stress?
2. Kommt es bei der Maus zu einer altersassoziierten Akkumulation von Deletionen mit einem ähnlichen Verteilungsmuster wie beim Menschen? Falls ja, wird diese durch eine Kreatingabe beeinflusst?
3. Finden sich bei der Maus in Analogie zum Menschen COX-defiziente Neurone als Ausdruck einer funktionellen Störung in Folge von oxidativem Stress bzw. Deletionen? Wenn ja, wird deren Auftreten durch eine Kreatindiät beeinflusst?

Aus diesen Zielsetzungen ergeben sich folgende methodische Anforderungen:



1. Quantifizierung von Lipofuszin im Hippocampus.

- Anfertigung von Gewebeschnitten aus dem Gehirn der Maus nach langfristiger Gabe von Kreatin.
- Etablierung einer fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Lipofuszingranula im Hippocampus.
- Etablierung eines softwaregestützten Analyseverfahrens zur Quantifizierung von Lipofuszin.

2. Messung von Deletionen der mtDNA.

a) Darstellung von Deletionen mittels long range-PCR.

- Extraktion von DNA aus Hirnhomogenat.
- Etablierung einer lrPCR der mtDNA mit verschiedenen Primerpaaren.

a) Quantifizierung von Deletionen mittels real time-PCR

- Lasermikrodissektion einzelner Neurone der CA2-Region des Hippocampus
- Extraktion der DNA aus Homogenat und lasermikrodissektiertem Material.
- Etablierung einer rtPCR mit Primerpaaren für die ND1- und ND4-Region der mtDNA.
- Etablierung eines Algorithmus für die Interpretation und Auswertung der erhaltenen Messdaten.

3. Darstellung und Quantifizierung COX-defizienter Neurone.

- Anfertigen von Kryo-Schnitten aus dem Gehirn der Maus und dem Muskel von CPEO-Patienten.
- Etablierung einer histochemischen Mehrfachfärbung (COX/SDH-Färbung) zur Darstellung COX-defizienter Neurone im Gehirn der Maus.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Tiere und Tierhaltung

#### 3.1.1 Tiere und Gruppeneinteilung

In der CreaLife-Studie wurden nach der Diät und dem Zeitpunkt ihrer etwaigen Tötung die in Tabelle 3.1 dargestellten Gruppen unterschieden. Dabei wurden drei verschiedene Endpunkte gewählt:

1. Spontanes Eintreten des Todes
2. Kontrollierte Tötung nach 18 Monaten
3. Kontrollierte Tötung nach 24 Monaten

Tabelle 3.1: Übersicht der Gruppeneinteilung der CreaLife Studie: Gruppeneinteilung, erreichtes Alter und Anzahl der Tiere, die mit Verum oder Placebo behandelt wurden.

Gruppe Nr.	Alter der Tiere	Anzahl	Diät
1	Keine Tötung, $613 \pm 84$ Tage	61	Verum
2	Keine Tötung, $563 \pm 95$ Tage	61	Placebo
3	Kontrollierte Tötung nach 18 Monaten	10	Verum
4	Kontrollierte Tötung nach 18 Monaten	10	Placebo
5	Kontrollierte Tötung nach 24 Monaten	10	Verum
6	Kontrollierte Tötung nach 24 Monaten	10	Placebo

Der zweite Zeitpunkt der kontrollierten Tötung im Alter von 24 Monaten wurde gewählt, um den Effekt von Kreatin direkt zwischen zwei Gruppen nahe dem Ende ihrer natürlichen Lebenserwartung unter kontrollierten Bedingungen untersuchen zu können (Querschnittskomponente der Studie).

#### 3.1.2 Tierhaltung

Die Inzucht-C57BL/6J-Mäuse wurden in der German Mouse Klinik der GSF (Neuherberg) in isoliert belüfteten Typ II Käfigen mit Sägespänen als Einstreu bei einer Temperatur von 20 bis 24°C, Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%, einem 20× Luftaustausch pro Stunde und

### 3.1 Tiere und Tierhaltung

12/12-h Hell-/Dunkelrhythmus gehalten. In einem Intervall von 12 Wochen wurden sie nach den FELASA-Richtlinien auf das für Inzucht-Mäuse vorgeschriebene Maß auf Mikroorganismen getestet [230]. Die Tierhaltung und die durchgeführten Prozeduren entsprachen den Richtlinien für Tierhaltung und den Umgang mit Tieren der GSF und der deutschen Rechtsprechung.

#### 3.1.3 Ernährung und Kreatin-Diät

Die Tiere wurden bis zum 12. Lebensmonat mit einem standardisierten Futter (1314, Altromin) und Wasser ad libitum versorgt. Ab einem Alter von  $365 \pm 2$  Tagen wurden 81 Tiere mit einer um 1 % Kreatin supplementierten Diät gefüttert, weitere 81 Kontrolltiere mit einer äquikalorischen Standarddiät.

#### 3.1.4 Tötungskriterien und standardisierte Tötung

Die Tiere wurden getötet, wenn sie folgende offensichtlichen Anzeichen von Krankheit aufwiesen, welche nicht mit den Tierhaltungs-Richtlinien konform waren:

- Eingeschränktes Bewegungsvermögen
- Schnelle oder flache Atmung
- Kauerstellung
- Deutliche Abmagerung
- Diarrhoe
- Ulzerierende Dermatitis oder andere Hautläsionen größer als  $1\text{cm}^2$
- Starke Gewichtsverluste oder Neoplasien

Die kontrollierte Tötung erfolgte mittels  $\text{CO}_2$ -Euthanasie.

#### 3.1.5 Organentnahme und Konservierung

Nach der Tötung wurden die Tiere seziiert und repräsentative Proben aus Gehirn, Muskel und Niere entnommen, welche in 4 % Formalin fixiert und einer histologischen Routineuntersuchung zugeführt wurden. In dieser wurden Hämatoxilin-Eosin gefärbte Paraffinschnitte analysiert. Zusätzlich wurden oben genannte Gewebearten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weitere Untersuchungen bei  $-80^\circ\text{C}$  kryokonserviert.

## 3.2 Quantifizierung von Lipofuszin

### 3.2.1 Material

**Tiere** Für die Quantifizierung von Lipofuszin wurden Gehirne der Tiere aus den Gruppen 5 und 6 verwendet. Die Tiere dieser Gruppen wurden nach einjähriger Gabe von Kreatin im Alter von 24 Monaten kontrolliert getötet. Jeweils eine Hemisphäre pro Tier wurde in Paraffin eingebettet. Zur Verfügung standen für Verum- und Placebogruppe jeweils sechs Tiere bzw. Hemisphären.

Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die genaue Altersverteilung der beiden Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der Applikation des Verums und der Tötung.

Tabelle 3.2: Auflistung des Alters der Tiere bei Versuchsbeginn und Tötung für Tiere mit und ohne Gabe von Kreatin.

Alter in Tagen	bei Versuchsbeginn		bei Tötung	
	Verum	Kontrolle	Verum	Kontrolle
Tier Nr.				
1	364	361	740	681
2	361	368	737	745
3	361	365	737	742
4	364	368	740	733
5	366	361	731	729
6	365	365	741	685
Mittelwert	363,50	364,67	737,67	719,17
Standardabw.	2,07	3,14	3,67	28,64

**Chemikalien und Verbrauchsmaterialien** In der vorliegenden Arbeit wurden für die Quantifizierung von Lipofuszin die in Tabelle 3.3 gelisteten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien verwendet.

**Hard- und Software** Für eine Listung der Geräte und Software, welche für die Quantifizierung von Lipofuszin im Hippocampus verwendet wurden siehe Tabelle 3.4.

### 3.2.2 Methoden

#### Präparation des Gewebes und Aufbewahrung

**Anfertigen von Paraffinschnitten und Ebenenbestimmung** Von jeder eingebetteten Hemisphäre wurde mit dem Mikrotom eine 8er-Serie 10 $\mu$ m dicker Schnitte in saggitaler

### 3.2 Quantifizierung von Lipofuszin

Tabelle 3.3: Für die Quantifizierung von Lipofuszin verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien mit Produktnummer und Hersteller.

<b>Chemikalie / Verbrauchsmaterial</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Objektträger Superfrost	7201277	Menzel Gmbh + Co KG
Deckgläser	190002450	IDL (Nidderau)
PBS	1770	Sigma-Aldrich
Ethanol	1.009.832.511	Merck
Roti-Histol	6640.2	Carl Roth (Karlsruhe)
Roti-Histokit	6638.1	Carl Roth (Karlsruhe)

Tabelle 3.4: Für die Quantifizierung von Lipofuszin verwendeten Geräte und Software, Produktbezeichnungen und Hersteller.

<b>Geräte und Software</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mikrotom	Microm	Walldorf
Mikroskop mit Fluoreszenzlampe	AxioVert 200M + Fluor Arc	Zeiss
Digitalkamera	AxioCamHRC	Zeiss
Stereotaktischer Atlas	The Mouse Brain 2ed.	Elsevier
Bildverarbeitungssoftware	Image Pro Plus Version 5.0	MediaCybernetics
Personal – Computer	Standard-PC	Fujitsu-Siemens

### 3.2 Quantifizierung von Lipofuszin

Schnittebene mit jeweils drei Schnitten pro Objektträger (OT) angefertigt. Dabei wurde jeweils ein Schnitt auf die OT 1–8 aufgenommen, dann wieder bei OT Nr.1 begonnen. Der Schnittvorgang wurde von medial nach lateral fortgesetzt. Zur Orientierung wurden die frischen Schnitte als Nativpräparat unter dem Mikroskop mit den dargestellten Ebenen des eines etablierten neuroanatomischen Mausatlases [231] verglichen. Etwaige Abweichungen von der saggitalen Schnittführung der Präparate im Vergleich zum Atlas wurden durch Berichtigung des Schnittwinkels so korrigiert, dass die Schnittebenen wieder kongruent waren. Mit dem Aufnehmen der Schnitte wurde nach der eindeutigen mikroskopischen Identifizierung des Hippocampus begonnen. Eine Lichtexposition während des Trockenvorganges wurde vermieden.

**Lagerung** Um eine Verfälschung der Quantifizierung durch Risse oder ähnliche Artefakte zu vermeiden, wurden nur technisch einwandfreie Schnitte aufbewahrt und analysiert. Die Schnitte wurden bei (+6°C) in Objektträgerkästen für histologische Präparate gelagert. Eine zusätzliche Lichtexposition wurde somit ausgeschlossen.

**Entparaffinierung** Vor der Aufnahme der Bilder wurden die gefertigten Hirn-Schnitte nach folgendem Protokoll entparaffiniert.

Tabelle 3.5: Protokoll zum Entparaffinieren: Arbeitsschritte und Durchführung.

Arbeitsschritt Nr.	Durchführung	
	Zeit	Chemikalie
1	5min	0,1M PBS
2	5min	70% Ethanol
3	2 mal 3min	96% Ethanol
4	2 mal 3min	100% Ethanol
5	2 mal 10min	Rotihistol
6	eindecken in Rotihistokit	

### Analyse der Schnitte

**Generieren digitaler Aufnahmen** Jeder zweite Objektträger wurde für das Akquirieren digitaler Aufnahmen der Lipofuszingranula verwendet, was pro Tier einer Anzahl von insgesamt 12 digitalisierten Schnitten des Hippocampus entspricht. Für die Digitalisierung wurden nur Präparate ohne Artefakte verwendet, die gemäß den stereotaktischen Koordinaten des verwendeten Atlases [231] zwischen 0,85 mm und 1,2 mm lagen.

Verwendet wurde das AxioVert 200M Mikroskop von Zeiss (Jena), welches mit der dazugehörigen AxioCamHRC ausgestattet war. Als Fluoreszenzlampe wurde eine FluoArc benutzt, welche zu Beginn der Aufnahmen 98 und an deren Ende 139 Betriebsstunden

### 3.2 Quantifizierung von Lipofuszin

verzeichnete. Die Aufnahmen wurden unter Einsatz eines Rhodamin-Filters durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug standardisiert 300 ms bei 25 % und einer Kondensoreinstellung von 0,15. Der Kamera wurden für die Aufnahme 100 % des Lichtweges zugeführt. Die Auflösung eines Bildes betrug 3900×3090 Pixel. Zunächst wurde unter 20facher Vergrößerung die CA1-Region aufgesucht, 40fach vergrößert und scharf gestellt. Erst dann wurde die Fluoreszenz zugeschaltet, die Digitalisierung vollzogen und die Fluoreszenz sofort nach Beendigung der Aufnahme wieder abgeschaltet. Beim Aufsuchen der verschiedenen Regionen fand eine Orientierung anhand der Morphologie bzw. denen für die Regionen spezifischen Zelltypen statt. Nach dem gleichen Vorgehen wurden Aufnahmen in 40facher Vergrößerung aus anderen Regionen des Hippocampus (CA2, CA3 und DG) akquiriert, dann nochmals zwei Aufnahmen in 20facher Vergrößerung von der CA1- und CA2-Region.

Es wurde stets streng darauf geachtet, sämtliche Einstellungen des Mikroskops und der Software konstant zu halten. Dies galt auch für die Einhaltung der Reihenfolge der Aufnahmen, falls dies in Ausnahmefällen nicht möglich war, wurde eine Kennzeichnung vorgenommen.

**Messung der Intensität** Eine Messung der Fluoreszenzintensität ist grundsätzlich nicht im Sinne eines Absolutwertes möglich, sondern nur als eine relative Quantifizierung. Dabei wird jedem Pixel eines Bildes ein entsprechender Wert zwischen 0-256 zugeordnet. Hohe Werte korrelieren mit einer starken, niedrige Werte mit einer schwachen Intensität. Letztendlich erhält man für jeden Intensitätswert die Anzahl übereinstimmender Pixel und kann so qualitative und quantitative Rückschlüsse über das Intensitätsprofil der digitalen Aufnahme ziehen.

**Softwaregestützte Bildanalyse** Von jedem Gehirn wurden je sechs Schnitte analysiert. Ausgewertet wurden die Bilder der 20fachen Vergrößerung aus der CA1- und CA2-Region mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes Image Pro Plus Version 5.0 (MediaCybernetics).

**Protokoll** Trotz optimaler Voraussetzungen für den Prozess der Digitalisierung - vom Anfertigen der Präparate bis zur Aufnahme - ließen sich geringfügige Differenzen in den Eigenschaften der Bilder feststellen. Diese äußerten sich in leichten Unterschieden des Intensitätsgrundniveaus der Aufnahmen, was wiederum eine falsch erhöhte Varianz der Messwerte des Lipofuszin-Gehalts für ein Gehirn nach sich zog. Da Intensitäten aber immer nur relativ und niemals absolut quantifiziert werden können, konnte dieses Problem wie folgt gelöst werden.

Das Protokoll für die Auswertung der Aufnahmen wurde dahingehend geändert, dass die Analyse nicht bei einem gleich bleibenden Intensitätsgrenzwert (treshold) vorgenommen wurde, sondern derselbe auf das Intensitätsgrundniveau abgestimmt wurde. Diese Verknüpfung mit der Hintergrundfluoreszenz verbesserte sowohl die Übereinstimmung des mikroskopisch bzw. optisch erwarteten Gehalts von Lipofuszin-Granula mit dem von der Analysesoftware berechneten, als auch den Betrag der Varianz der Messwerte eines Tieres. Reliabilität und Spezifität der Methode konnten durch Einführung dieses Arbeitsschrittes

### 3.2 Quantifizierung von Lipofuszin

deutlich verbessert werden.

Theoretische Grundlage und Rechtfertigung der Änderung des Bildanalyseprotokolls waren folgende Überlegungen:

1. Wie unter 3.2.2 bereits angesprochen, wird jedem Pixel ein Intensitätswert von 0–256 zugeordnet. Der Intensitätswert, welchem die meisten Pixel zugeordnet werden, kann als Hintergrundwert oder auch Intensitätsgrundniveau bezeichnet werden.
2. Die Akkumulation von Lipofuszin zieht lokalisiert via Autofluoreszenz eine erhöhte Intensität nach sich. Eine mit Hilfe von Autofluoreszenz gewonnene Aufnahme kann als Summationsaufnahme von Intensitäten aufgefasst werden. Der von der Software berechnete Intensitätswert für eine Lipofuzinansammlung ( $I_L$ ) entspricht dem Intensitätsgrundniveau ( $I_0$ ) plus der für Lipofuszin spezifischen Intensität ( $I_{spez}$ ):  
$$I_L = I_0 + I_{spez}$$

Zur Verdeutlichung möglicher Fehlerquellen und der erheblichen Verbesserung der Auswertung folgendes fiktives Beispiel:

Man analysiert zwei unterschiedliche Schnitte des selben Tieres, erwartet also einen ungefähr gleichen Lipofuszingehalt, was nach subjektiver Schätzung anhand der Aufnahmen zutrifft. Der Lipofuszingehalt eines annähernd zweidimensionalen histologischen Präparates ergibt sich aus dem Anteil von Lipofuszin an der Gesamtfläche, dem Lipofuszin-Flächenprozentensatz. Der Flächenprozentensatz betrage ca. 25 %. Im Schnitt 1 beziffert sich der durch die Software automatisch berechnete Hintergrundwert auf einen Betrag von 60 Intensitätspunkten, im Schnitt 2 auf einen Wert von 65 Intensitätspunkten. Würde man nun einen Treshold von 80 Intensitätspunkten auf beide Bilder anwenden, ergäbe sich für Schnitt 2 ein falsch hoher Gehalt von Lipofuszin, beispielsweise 30 %. Dieser kommt dadurch zustande, dass der Intensitätsunterschied zur Unterscheidung von Hintergrundintensität und der Intensität von Lipofuszingranula zu gering ist und folglich Pixel im Intensitätsgrenzbereich falsch positiv als Lipofuszin in das Ergebnis miteingerechnet werden. Wählt man den Treshold aber mit Rücksichtnahme auf den Intensitätswert des Hintergrundes, ergeben sich weitaus sinnvollere Resultate. In diesem Beispiel müsste man den Intensitätsgrenzwert für Schnitt 2 bei 85 Intensitätspunkten ansiedeln, was zu einem realistischen Wert von 25 % wie in Schnitt 1 führen würde.

Empirisch hat sich auf dieser theoretischen Grundlage folgendes Vorgehen als gut mit der subjektiven mikroskopischen Schätzung der Lipofuszinmenge übereinstimmend und praktikabel erwiesen: Für jedes Bild wurde mit Hilfe von Image Pro Plus zunächst eine Analyse der Intensitätswerte sämtlicher Bildpunkte vorgenommen und auf diesem Wege der Intensitätswert des Hintergrundes bestimmt. Von diesem Hintergrundwert aus wurde der Treshold 20 Intensitätspunkte höher gewählt, was mit dem erwarteten Gehalt an Lipofuszin optisch gut übereinstimmte. Beispiel: Die meisten Pixel einer Aufnahme haben eine Intensität von 67, was somit dem Hintergrundwert entspricht. Der Treshold wird auf einen Wert von  $67 + 20 = 87$  festgesetzt. Unterschiede, die sich trotz exakt gleicher Bedingungen bei der Generierung der Bilder ergaben, konnten so gut ausgeglichen werden. Eine künstliche Verfälschung der Grenzwerte durch den Untersucher war nicht zu befürchten, da die



### 3.2 Quantifizierung von Lipofuszin

Zuordnung der Pixel zu den Intensitätswerten automatisch durch die Software erfolgte und nur ein richtiges Ablesen erforderlich war. So mussten beispielsweise falsch niedrige Hintergrundwerte, die von Artefakten wie Rissen herrührten, erkannt werden, was aber nur in Ausnahmefällen vorkam.

Die Möglichkeit einer Beeinflussung durch den Untersucher bestand allerdings in der Auswahl des in die Analyse miteinbezogenen Bereiches, der AOI (area of interest). Um den Flächenprozentwert möglichst genau und unabhängig vom Bildausschnitt zu evaluieren, wurde der in die Auswertung einzubeziehende Bildausschnitt (AOI) manuell für jedes Bild ausgewählt. Bei der Auswahl der AOI wurde das Pyramidenzellband des Hippocampus der gewünschten Region manuell möglichst eng umgrenzt, ohne aber Lipofuszin-positive Zellen auszuschließen (siehe Abbildung 3.1).

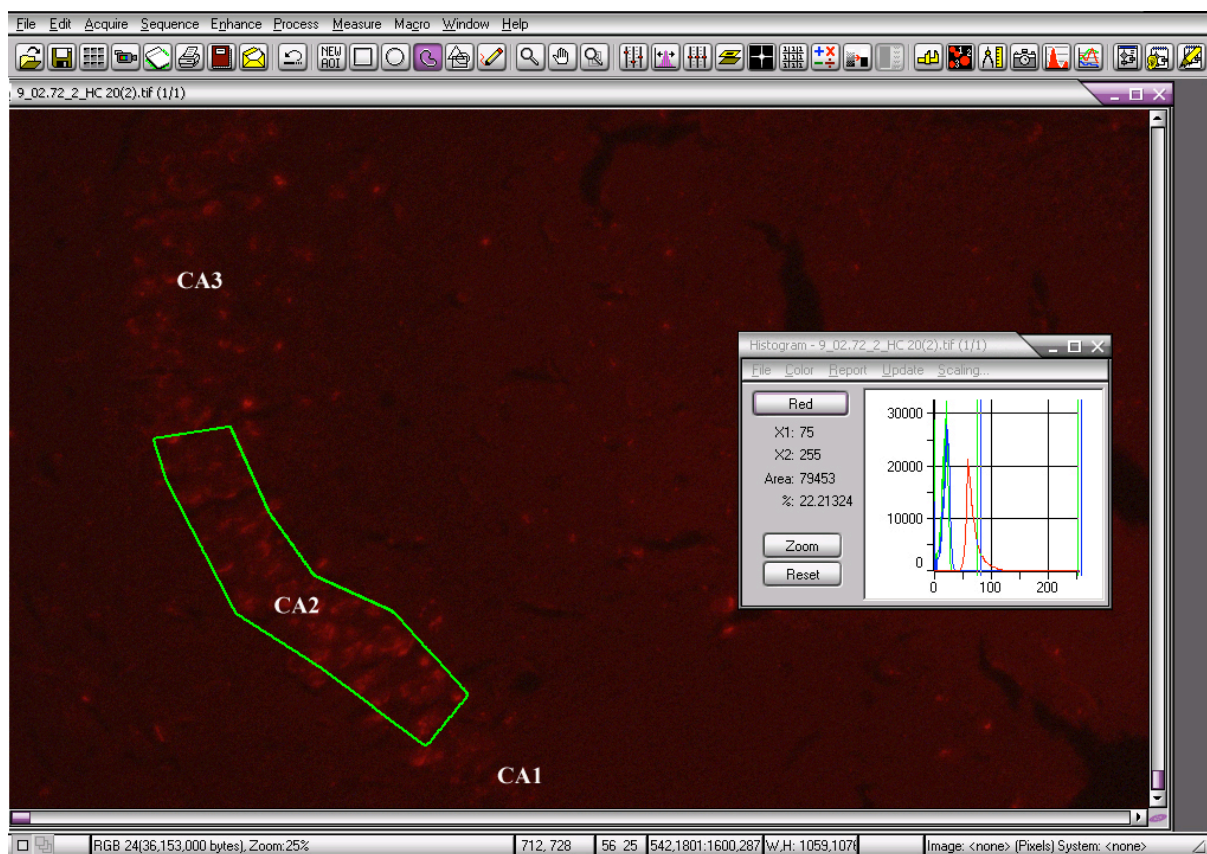


Abbildung 3.1: Auswahl des in die Bildanalyse einbezogenen Bereiches, der area of interest (AOI). Hier ergibt sich für das ausgewählte Pyramidenzellband der CA2-Region des Hippocampus ein Lipofuszingehalt von 22,2 Flächenprozent.

### 3.3 Quantifizierung COX-negativer Zellen

#### Statistik

**Hypothesen** Folgende Hypothesen sollten in der vorliegenden Arbeit überprüft werden:

- *Nullhypothese ( $H_0$ ):*

Der Gehalt an Lipofuszin in der CA1-/CA2-Region des Hippocampus der weiblichen C57BL/6J-Maus wird durch die chronische orale Supplementation mit Kreatin im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert.

- *Alternativhypothese ( $H_1$ ):*

Der Gehalt an Lipofuszin in der CA1-/CA2-Region des Hippocampus der weiblichen C57BL/6J-Maus wird durch die chronische orale Supplementation mit Kreatin im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert.

**Deskriptive Statistik** Für obengenannte Relationen wurden im Rahmen der deskriptiven Statistik sowohl für die intraindividuellen Berechnungen innerhalb eines Tieres, als auch für die interindividuellen Auswertungen innerhalb einer Behandlungsgruppe Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

**Induktive Statistik** Als Entscheidungshilfe für die Annahme bzw. Verwerfung der Nullhypothesen sollte ein Test zum Mittelwertvergleich herangezogen werden. Nach dem zentralen Grenzwertsatz der Statistik gilt, daß ein Mittelwert aus  $n$  Messungen annähernd normalverteilt ist und zwar unabhängig von der Verteilung der einzelnen Messungen. Somit konnte ein zweiseitiger t-Test zum Vergleich des Lipofuszingehaltes im Hippocampus verwendet werden. Für die Überprüfung der Nullhypothese wurde eine Wahrscheinlichkeit für den Fehler der 1. Art ( $\alpha$ ) von 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) akzeptiert.

## 3.3 Quantifizierung COX-negativer Zellen

### 3.3.1 Material

**Tiere** Für die Quantifizierung von *Cytochrom C Oxidase (COX)*-defizienten Zellen wurden tiefgefrorene Hirne der Verum- ( $n = 2$ ) und der Placebogruppe ( $n = 3$ ) präpariert. Das Alter der Mäuse belief sich auf 671–731 Tage.

**Positivkontrolle** Als Positivkontrolle wurde der Muskel eines CPEO-Patienten mit zahlreichen bereits nachgewiesenen COX-negativen Muskelfasern verwendet.

**Chemikalien und Verbrauchsmaterialien** In der folgenden Tabelle 3.6 sind die für die COX/SDH-Färbung benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

### 3.3 Quantifizierung COX-negativer Zellen

Tabelle 3.6: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien COX/SDH-Färbung.

Chemikalie / Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
Leica MembranSlides PEN-membran 2,0µm	11505158	Micro Dissect Gmbh (Herborn )
Ojektträger Superfrost	7201277	Menzel Gmbh + Co KG
Diaminobenzidin (DAB)	D-5637	Sigma
Cytochrom C	C-2506 (Pferdeherz)	Sigma
Natrium Succinat	S-2378	Sigma
Nitro Blau Tetrazolium	N-6876	Sigma
Phenazine Methosulphat	P-9625	Sigma
Natrium Azide	BDH30111	Sigma
Catalase	C-9322	Sigma
PBS	1770	Sigma-Aldrich
Histo-Clear	HS-202	National Diagnostics
Deckgläser	190002450	IDL (Nidderau)

#### Herstellung von Lösungen und Aliquots

1. Diaminobenzidin (DAB) Aliquots (800 µl):
  - 36 mg 5 mM DAB in 10 ml  $H_2O$  auflösen
  - 10 ml 0,2 M Phosphatpuffer dazugeben (pH 7,5)
  - Lösungs-pH bei 25°C auf 7,0 einstellen
  - In 1,5 ml Eppendorf-Tubes aliquotieren
  - Schnellgefrieren in flüssigem Stickstoff (Loch in den Deckel machen!)
  - Vor Gebrauch schnell auftauen
2. Cytochrom C Aliquots (420 µl):
  - 62 mg 500 µM Cytochrom C in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) auflösen
  - nur leicht schütteln
  - Lösungs-pH bei 25°C auf 7,0 einstellen (normalerweise nur wenig Manipulation notwendig)
3. Natrium Succinat Aliquots (250 µl):
  - 3,5 g 1,3 M Natrium Succinat in 10 ml, 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) auflösen
  - Lösungs-pH bei 25°C auf 7,0 einstellen (normalerweise 6-8 Tropfen 1M HCl)
4. Nitro Blau Tetrazolium (NBT) Aliquots (800 µl):
  - 49 mg 1,875 mM NBT in 32 × 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) auflösen

### 3.3 Quantifizierung COX-negativer Zellen

- Lösungs-pH bei 25°C auf 7,0 einstellen (normalerweise keine Manipulation notwendig)
5. Phenazine Methosulphat (PMS) Aliquots (250 $\mu$ l):
- 6,12 mg 2,0 mM PMS in 10 $\times$  0,1M Phosphatpuffer (pH 7,0) auflösen
  - Lösungs-pH bei 25°C auf 7,0 einstellen (normalerweise nur wenig Manipulation nötig)
  - Alles in einem dunklen Raum pipettieren und lichtgeschützt verstauen
6. Natrium Azide Aliquots ( 100 $\mu$ l):
- 32,5 mg 100 mM Natrium Azide in 5,0 ml, 0,1 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) auflösen
  - Lösungs-pH bei 25°C auf 7,0 einstellen (normalerweise keine Manipulation notwendig)

**Lagerung** Sämtliche Materialien wurden bei -20°C bis -40°C aufbewahrt und erst bei Bedarf zügig aufgetaut.

**Geräte und Software** Für die histologische Beurteilung der Präparate wurde die gleiche Ausstattung verwendet wie bei der Analyse von Lipofuszin (Tabelle 3.4)

#### 3.3.2 Methoden

##### Präparation und Aufbewahrung des Gewebes

**Anfertigen von Kryo-Schnitten und Ebenenbestimmung** Um Artefakte zu vermeiden, wurden die zu untersuchenden Gehirne 12–14 h vor dem Schneiden nicht mehr bei -80°C luftdicht gelagert, sondern bei -20°C.

Untersucht wurden pro Tier  $n = 6$ , in der Koronarebene orientierte, 10  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte. Die Objekttemperatur betrug -20°C, die Kammertemperatur -18°C und der Schnittwinkel 3°. Pro Objektträger wurden drei aufeinander folgende Schnitte aufgenommen. Zur Orientierung wurden die frischen Schnitte als Nativpräparat unter einem Axio-Vert 200M Mikroskop mit den dargestellten Ebenen des stereotaktischen Atlas [231] verglichen. Etwaige Abweichungen von der koronaren Schnittführung der Präparate im Vergleich zum Atlas wurden durch Berichtigung des Schnittwinkels so korrigiert, dass die Schnittebenen wieder kongruent waren. Mit dem Aufnehmen der Schnitte wurde nach der eindeutigen mikroskopischen Identifizierung des Hippocampus begonnen. Auf jeden zu untersuchenden Objektträger wurden neben den Hirnschnitten zusätzlich  $n = 2$  Schnitte der Positivkontrolle aufgebracht. Der Muskel wurde quer zum Verlauf der Muskelfasern geschnitten.

**Lagerung** Nur technisch einwandfreie Schnitte wurden aufbewahrt. Falls die COX/SDH-Färbung nicht direkt nach dem Trockenvorgang durchgeführt werden konnte, wurden die Schnitte luftdicht verpackt und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.3 Quantifizierung COX-negativer Zellen

#### Die COX/SDH-Färbung

**Funktion der kombinierten COX/SDH-Färbung: theoretischer Hintergrund** Die sequentielle COX/SDH-Färbung nutzt die in der Zelle vorhandene bzw. nicht vorhandene Aktivität der Cytochrom C-Oxidase und Succinatdehydrogenase (SDH). Dabei färben sich in einem ersten Färbeschritt COX-positive Zellen braun an, COX-negative Zellen hingegen können das zugegebene Cytochrom C nicht oxidieren und bleiben farblos. Zur besseren Darstellung folgt die SDH-Färbung. Hier stellen sich alle Zellen dunkelblau dar, welche zuvor Cytochrom C nicht umsetzen konnten, aber eine ausreichende SDH-Enzymaktivität besitzen. COX-positive Zellen sind durch die vorangegangene Färbung für die SDH-Färbung blockiert und stellen sich weiterhin braun dar.

Eine verminderte Aktivität der COX ist Hinweis auf eine funktionelle Beeinträchtigung der Zelle durch eine Störung der mitochondrial kodierten Untereinheiten von Komplex IV. Die SDH ist wesentlich robuster als die COX, ihre Funktion bleibt im Falle einer Schädigung wesentlich länger erhalten als die der COX. Außerdem wird sie ausschließlich nukleär kodiert, ist also von Defekten der mtDNA nicht betroffen.

**Protokoll der kombinierten COX/SDH-Färbung** Die zu färbenden Schnitte wurden 3–4 h vor der Bearbeitung, noch luftdicht verpackt (zur Vermeidung von Kondensat), von  $-80^{\circ}\text{C}$  auf Raumtemperatur aufgetaut. Das Protokoll der Färbung kann Tabelle 3.7 entnommen werden.

**Optimierung** Die für humanes Muskel- und Hirngewebe bereits optimierte Färbung wurde zur Detektion von COX-negativen Zellen im Hirn der Maus in Vorversuchen nochmals optimiert, um denkbaren Unterschieden in der Enzymausstattung und Gewebebeschaffenheit gerecht zu werden. Zu diesem Zweck wurden an sechs Objektträgern mit zwei mal zwei Hirnschnitten und je zwei Positivkontrollen die Inkubationszeiten der beiden Färbeschritte systematisch variiert.

**Mikroskopische Analyse** Die gefärbten Präparate wurden zunächst unter 20facher, anschließend unter 40facher Vergrößerung mit einem AxioVert 200M Mikroskop von Zeiss histologisch beurteilt. Dabei wurde zunächst das einwandfreie Funktionieren der Reaktion anhand der Positivkontrolle überprüft. Fragliche COX-defiziente Zellen bzw. ähnlich aussehende Artefakte wurden markiert, fotografiert und von einer zweiten Person nochmals unabhängig beurteilt.

### 3.3 Quantifizierung COX-negativer Zellen

Tabelle 3.7: Protokoll für die kombinierte COX/SDH-Färbung: Färbeschritte und deren Durchführung.

<b>Färbeschritt</b>	<b>Durchführung</b>
<b>COX-Färbung</b>	
1	200 µl Cytochrom C in 800 µl DAB auflösen
2	Catalase hinzufügen und gut vortexen
3	Auf Präparat aufbringen
4	Bei 37°C für 40 min inkubieren
5	2 × in PBS waschen
6	Überstehende Flüssigkeitsreste vorsichtig abtupfen
<b>SDH-Färbung</b>	
7	100 µl Natrium Succinat + 100 µl PMS (lichtgeschützt!) + 10 µl Natrium Azide in 800 µl NBT auflösen und vortexen
8	Auf Präparat aufbringen
9	Bei 37°C für 50 min inkubieren
10	2 × in PBS waschen
11	10 × eintauchen in 70% Ethanol
12	10 × eintauchen in 95% Ethanol
13	10 min in 100% Ethanol zum Differenzieren
14	10 × in HistoClear eintauchen
15	Deckmedium und Deckglas

### 3.4 Quantifizierung von Deletionen der mtDNA mit der quantitativen real time-PCR aus Hirn- und Muskelhomogenat

#### 3.4.1 Material

**Tiere** Für die Bestimmung von Deletionen wurden die Gehirne von Tieren der Verum- ( $n = 6$ ) und Placebogruppe ( $n = 4$ ) untersucht. Das Alter der Tiere belief sich auf 544–698 Tage. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Skelettmuskel stammte von jeweils  $n = 3$  Tieren aus beiden Gruppen, das Alter der Mäuse betrug 648–689 Tage.

**Chemikalien und Verbrauchsmaterialien** Die für die Untersuchung von Deletionen aus Hirn- und Muskel-DNA verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8: Die für die Quantifizierung von Deletionen mittels rtPCR benötigten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien mit Produktnummer und Hersteller

Chemikalie/ Verbrauchsmaterial	Produkt-Nr.	Hersteller
QIAamp DNA Micro Kit	56304	Qiagen GmbH, Hilden (D)
LightCycler TaqMan Master	04 535 286 001	Roche Diagnostics GmbH Penzberg (D)
Ultra Pure BSA, Non-Acetylated	2616	Ambion (Ltd), Cambridgehire (UK)
Primer		MWG-Biotech AG
Fluoreszenz-Proben		MWG-Biotech AG

**Geräte und Software** Die für die Reaktion der rtPCR genutzten Hard- und Software ist in Tabelle 3.4.1 gelistet.

Tabelle 3.9: Die für die Quantifizierung von Deletionen mittels rtPCR benötigten Geräte und deren Software mit Produkt-Nr. und Hersteller

Geräte und Software	Produktbezeichnung	Hersteller
LightCycler		Roche
Personal-Computer	Macbook pro	Apple

### 3.4 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen in Hirn- und Muskelhomogenat mit real time-PCR

#### 3.4.2 Methoden

##### Isolierung von DNA

**Gehirn** Für die Extraktion von DNA aus Hirngewebe wurden pro Tier 225 mg Material in flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert und mit einem Extraktions-Kit nach dem Protokoll des Herstellers weiterverarbeitet. Die DNA wurde in TE-Puffer (1 mM EDTA in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) gelöst.

**Skelettmuskel** Aus dem Skelettmuskel wurde die DNA mit Hilfe des *QIAamp DNA Micro Kit* Extraktionskits nach den vom Hersteller beschriebenen Extraktionsschritten (*QIAamp DNA Micro Kit Handbook protocol for purification of genomic DNA from tissues*) extrahiert und in autoklaviertem  $H_2O$  gelöst.

**Blut** Die Blut-DNA wurde ebenfalls mit Hilfe des Extraktions-Kits gewonnen. Hier wurde das Protokoll des Herstellers für kleine Mengen von Blut angewandt (*QIAamp DNA Micro Handbook protocol for purification of genomic DNA from small volumes of blood*).

**Lagerung** Die extrahierte DNA wurde im Kühlschrank bei  $+6^\circ\text{C}$  gelagert.

##### Die real time-PCR

**Theoretischer Hintergrund der real time-PCR** Die quantitative real time-PCR (rtPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die nach jedem PCR Zyklus in "Echtzeit" durchgeführt werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des PCR Produkts zu. Am Ende der aus mehreren Zyklen bestehenden PCR-Reaktion wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Mit Hilfe der *Standardkurven-* oder der  $\Delta\Delta CT$ -Methode lassen sich Rückschlüsse auf die initial eingesetzte DNA Menge ziehen. Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR Methoden die erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung vornehmen.

Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen. Eine andere Möglichkeit ist, den Fluorescence resonance energy transfer (FRET) auszunutzen. Ein durch eine Lichtquelle angeregtes Donor-Fluorochrom (Reporter), gibt einen Teil seiner Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt.

In der Vorliegenden Arbeit wurde eine TaqMan-Sonde verwendet, welche mit dem Quencher TAMRA und dem Reporter 6FAM markiert war. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität besitzt, die Sonde während



### 3.4 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen in Hirn- und Muskelhomogenat mit real time-PCR

der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

**Spezifische Verteilung der Deletionen als Grundlage für die Quantifizierung mittels rtPCR** Voraussetzung für die Quantifizierung von Deletionen der mtDNA mittels rtPCR ist deren spezifische Verteilung. Aus systematischen Untersuchungen der Verteilung von Deletionen weiß man, dass diese fast ausschließlich den so genannten *major arc* des mitochondrialen Genoms betreffen. In dieser Region ist die ND4-Region, nicht aber die ND1-Region lokalisiert, welche sich im *minor arc* befindet [59]. Mittels rtPCR wird nun die Zahl der Kopien von ND1 und ND4 einer Probe bestimmt. Aus dem Verhältnis von ND1/ND4 lassen sich jetzt Aussagen über den Anteil der von Deletionen betroffenen mtDNA treffen. Eine absolut quantitative Bestimmung ist somit unnötig, eine relative reicht aus. Als Bezugswerte müssen aber bei jedem Lauf die verwendeten Standardproben ohne Deletionen (Blut-DNA) vorhanden sein. Die ND1- und ND4-Reaktion müssen von gleicher Effizienz sein.

**Berechnung der von Deletionen betroffenen mtDNA** Zur Berechnung der *crossing points* (CP) wurde die genauere, aber etwas aufwendigere *fit point*-Methode gewählt. Die erhaltenen CP für ND1 und ND4 wurden in Bezug zu der Kontroll-DNA bekannter Konzentration ohne Deletionen gesetzt. Eine Berechnung der Kopienanzahl von ND1 und ND4 war somit möglich, diese mussten dann nur noch zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, um den Anteil deletierter mtDNA zu erhalten. Diese Überlegungen lassen sich in der folgenden Formel zusammenfassen:  $\%Deletionen = (1 - 2^{-(CP_{ND4} - CP_{ND1} - CP_{Kontroll})}) \cdot 100$  [59]

**Verwendete Primer und Probes** Für die rtPCR wurden die in Tabelle 3.10 beschriebenen Primer und Probes verwendet.

**Protokoll der rtPCR** Das nachfolgende Protokoll (Tabelle 3.11) ist für ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l ausgelegt. Je 5  $\mu$ l DNA-Lysat aus Skelettmuskel, Gehirn und CA2-Neuronen wurden getrennt mit den Kombinationen für ND1/ND4 Primer und Probes amplifiziert. Zu jedem DNA-Sample wurden außer den Primern und Probes je 9,6  $\mu$ l PCR grade  $H_2O$  und 4,0  $\mu$ l Master Mix (dessen Ansatz erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers) hinzugefügt. Die Primer hatten eine 0,5  $\mu$ M Endkonzentration, die Probes eine 0,1  $\mu$ M. Das einzusetzende Volumen wurde nach der Formel  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$  berechnet.

**Protokoll des LightCyclers** Für die rtPCR und die Fluoreszenzanalyse wurde das LightCycler-System von Roche verwendet. Dabei wurde mit folgendem Modus (Tabelle 3.12) der DNA-Amplifikation eine sehr gute Effizienz der Reaktion erzielt: Eine der eigentlichen Vervielfältigung der DNA vorangestellte 10 min dauernde Prä-Inkubationsphase bei 95°C diente zum einen der Denaturierung der DNA, zum anderen der Aktivierung der

### 3.4 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen in Hirn- und Muskelhomogenat mit real time-PCR

Tabelle 3.10: Für die Quantifizierung von Deletionen verwendete Primer und Probes und deren Sequenzen.

Primer und Probes	Sequenz
ND1	
mRTND1for	TTT ATC TCA ACC CTA GCA GAA ACA AA (3306-3331)
mRTND1rev	AAC CCT GAT ACT AAT TCT GAT TCT CCT T (3382-3355)
mRTND1probe	CGG GCC CCC TTC GAC CTG AC (3333-3352)
ND4	
mRTND4for	ATC ACT CCT ATT CTG CCT AGC AAA (11136-11159)
mRTND4rev	AGT CCT CGG GCC ATG ATT ATA GT (11210-11188)
mRTND4probe	CCA ACT ACG AAC GGA TCC ACA GCC G (11186-11162)

Tabelle 3.11: Übersicht Reagenzien und die jeweils benötigte Menge für ein Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l.

Reagenz	Menge Ansatz ND1 ( $\mu$ l)	Menge Ansatz ND4 ( $\mu$ l)
Master Mix 5 $\times$	4,0	4,0
Primer: mRTND1for	0,5	0
Primer: mRTND1rev	0,5	0
Probe: mRTND1	0,4	0
Primer: mRTND4for	0	0,5
Primer: mRTND4rev	0	0,5
Probe: mRTND4	0	0,4
H <sub>2</sub> O, PCR grade	9,6	9,6
DNA	5,0	5,0

### 3.4 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen in Hirn- und Muskelhomogenat mit real time-PCR

im MasterMix enthaltenen FastStart DNA-Polymerase. Die sich anschließenden 45 Zyklen der DNA-Amplifikation setzten sich jeweils aus drei Phasen zusammen. Am Beginn stand die Denaturierung über 10 s bei 95°C, gefolgt von einer Phase der Primer- und Probe-Hybridisierung mit der Ziel DNA von 30 s Dauer mit deren Amplifikation und Extension bei der Primer-spezifischen Temperatur von 58°C und abschließend über 2 s bei 72°C. Dem letzten Lauf folgte die Kühlung von Rotor und Temperaturkammer bei 40°C für 30 s.

Tabelle 3.12: Darstellung des LightCycler-Protokolls unter Berücksichtigung der Anzahl der Zyklen, des Analyse-Modus, der Zieltemperatur und der jeweiligen Zeitdauer.

Zyklen	Analyse-Modus	Zieltemperatur	Zeitdauer
<b>Prä-Inkubation</b>			
1	Keiner	95°C	10 min
<b>Amplifikation</b>			
45	Quantifizierung	95°C	10 s
		58°C	30 s
		72°C	2 s
<b>Kühlung</b>			
1	Keiner	40°C	30 s

**Negativkontrolle und Leerprobe** In der als Negativkontrolle verwendeten DNA durften keine Deletionen vorhanden sein. Diese Voraussetzung erfüllte die DNA sehr junger Tiere, da ein hoher Grad an Deletionen erst mit fortgeschrittenem Lebensalter zu erwarten ist, aber auch die in der vorliegenden Arbeit verwendete aus Blut gewonnene DNA.

Die Negativkontrolle wurde, zur genauen Quantifizierung und Überprüfung der Effizienz der Reaktion, pro Durchgang in mindestens drei unterschiedlichen Potenzierungen analysiert.

Als Leerprobe wurde das für die PCR verwendete PCR grade  $H_2O$  verwendet, was im Sinne einer Qualitätskontrolle des sterilen Arbeitens zugleich auch Verunreinigungen ausschloss. Die Negativkontrollen und die Leerprobe wurden stets zusammen mit der zu untersuchenden DNA bearbeitet.

**Gleichwertigkeit der neuen Quantifizierungsmöglichkeit mit bereits validierten Methoden** In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte hinsichtlich der Quantifizierung von Deletionen die Gleichwertigkeit der rtPCR mit bereits validierten Methoden wie dem

### 3.5 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen der CA2-Region mittels real time-PCR

Southern Blot gezeigt werden [59]. Auch stimmten die Ergebnisse der long range-PCR (lrPCR) mit den Daten der rtPCR überein.

**Statistik** Für den Vergleich der beiden Gruppen wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant akzeptiert.

## 3.5 Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus der CA2-Region mittels real time-PCR

### 3.5.1 Material

**Tiere** Die Quantifizierung von Deletionen in der mtDNA von Pyramidenzellen der CA2-Region des Hippocampus wurde bei Kreatin behandelten Tieren ( $n = 5$ ) und bei Tieren der Kontrollgruppe ( $n = 6$ ) durchgeführt. Das Alter der Tiere lag im Bereich von 544–689 Tagen.

**Chemikalien und Verbrauchsmaterialien** Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Quantifizierung von Deletionen in der mtDNA von Pyramidenzellen der CA2-Region des Hippocampus wurden die in Tabelle 3.13 gelisteten Verbrauchsmaterialien verwendet.

Tabelle 3.13: Für die Quantifizierung von Deletionen in der CA2-Region benötigte Verbrauchsmaterialien unter Angabe von Produkt-Nr. und Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Produkt-Nr.	Hersteller
Membrane Slides PEN-Membrane 2,0 $\mu$ m	11505158	Leica, MicroDissect GmbH
Chemikalien COX-Färbung	siehe COX Färbung	siehe COX Färbung
MicroAmp Fast Optical 96-Well reaction Plate	4346906	Applied Biosystems
QIAamp DNA Micro Kit	56304	Qiagen

**Geräte und Software** Für die Lasermikrodissektion der CA2-Region des Hippocampus und die anschließende Quantifizierung von Deletionen der mtDNA wurden folgende Geräte und Software verwendet (Tabelle 3.14).

### 3.5 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen der CA2-Region mittels real time-PCR

Tabelle 3.14: Für die Quantifizierung von Deletionen in der mtDNA der CA2-Region verwendete Geräte und Software unter Angabe von Produktbezeichnung und Hersteller.

Geräte und Software	Produktbezeichnung	Hersteller
Laser Micro Dissections Mikroskop	Leica LMD6000	Leica
Bedienungssoftware für oben genanntes Mikroskop	AVC Software Module	Leica

#### 3.5.2 Methoden

##### Präparierung und Aufbewahrung des Gewebes

**Anfertigen von Kryo-Schnitten und Ebenenbestimmung** Die Gefrierschnitte für die Lasermikrodissektion wurden wie bereits unter 3.3.2 beschrieben angefertigt. Der einzige Unterschied in der Verfahrensweise war das Aufziehen der Gefrierschnitte auf die, für die Lasermikrodissektion essentiellen, Membran Objektträger, welche an Stelle der zuvor gebrauchten Super Frost Objektträger verwendet wurden.

Die für die Lasermikrodissektion bestimmten Präparate wurden nach der Färbung luftdicht verschlossen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu weiteren Verarbeitung gelagert.

**Färbung** Für die Orientierung anhand der unterschiedlichen Zelltypen und die Differenzierung der gesuchten Zielregionen anhand der Zellmorphologie, war eine geeignete Darstellung des Gewebes mit einer Färbung Grundvoraussetzung.

Die histologische Färbemethode erfüllte dabei folgende Kriterien:

1. Die Zellmorphologie musste in ausreichendem Umfange zur Darstellung kommen, um die korrekte Identifizierung der CA2-Region des Hippocampus zu ermöglichen.
2. Die verwendeten Reagenzien und der Färbevorgang durften nachweislich keinen Einfluss auf die Anzahl der gemessenen Deletionen der mtDNA haben.
  - Der Störfaktor einer post mortem durch die Färbung verursachten, falsch hohen Anzahl von Deletionen im Sinne einer artifiziellen Schädigung der mtDNA musste ausgeschlossen werden.
  - Die Effizienz der rtPCR durfte durch die angewendete Färbung nicht beeinträchtigt werden.

Viele der zur Beurteilung der Zellmorphologie routinemäßig eingesetzten Protokolle, wie beispielsweise eine Nissel-Färbung, erfüllten die oben genannte Forderungen nicht zur Gänze.

In Übereinstimmung mit Vorversuchen und Publikationen der Arbeitsgruppe hatte die unter 3.3.2 beschriebene COX/SDH-Färbung keinen nachweisbaren Einfluss auf die Anzahl

### 3.5 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen der CA2-Region mittels real time-PCR

der gemessenen Deletionen in der mtDNA und die Effizienz der zu ihrer Messung notwendigen rtPCR [59]. Um die gezielte Lasermikrodissektion zu ermöglichen, wurde aus oben genannten Gründen eine abgewandelte COX-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Präparate wie unter 3.3.2 beschrieben gefärbt, nur die Inkubationszeit wurde mit 15 min deutlich geringer gewählt. Morphologisch waren die Hirnregionen nach dieser Zeit sehr gut zu differenzieren und ein immer noch denkbarer Störfaktor durch die einwirkenden Substanzen minimiert. Selbstverständlich wurden die Präparate nach der Differenzierung in Ethanol nicht mit einem Deckmedium bzw. Deckglas versehen.

#### Lasermikrodissektion der CA2-Region des Hippocampus

**Prinzip der Lasermikrodissektion** Die Technologie der Lasermikrodissektion ist eine relativ junge Methode der Zellseparation. Mit ihrer Hilfe können aus Geweben kleine Bereiche – z.B. einzelne Zellen – ausgeschnitten werden. Dazu wird über ein Objektiv ein kohärenter gepulster Laserstrahl auf die Probe gerichtet. Dabei wird durch die hohe Energie des Lichts das Gewebe im Fokus zerstört. Die gewünschte Schnittlinie entsteht durch die Aneinanderreihung vieler Impulse.

Da die Laserimpulse sehr kurz sind (ca. 4 ns), kann ein Wärmetransport in umliegendes Gewebe vollständig ausgeschlossen werden; es handelt sich um eine kalte photoablativ Dekomposition. Der ausgeschnittene Zielbereich der Probe fällt anschließend gemeinsam mit der Trägermembran in ein Tube für die folgende Amplifikation oder Analyse.

Meist baut das Gerät zur Lasermikrodissektion auf einem Mikroskop auf, welches neben der entsprechenden Steuerungssoftware um einen speziellen Probenstisch und vor allem um den Laser erweitert wurde. Bei dem verwendeten Laser handelt es sich um einen Diodenlaser mit 355 nm Wellenlänge. Diese ermöglichen durch die hohe Pulsfrequenz schnelle und präzise Schnitte. Abhängig vom verwendeten Objektiv kann ein Fokusdurchmesser von unterhalb 1  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Der Ablauf der Lasermikrodissektion kann in Abbildung 3.2 nachvollzogen werden.

**Durchführung** Der vorbereitete Schnitt wurde mit dem Präparat nach unten in der Halterung fixiert. Nach dem Scharfstellen und der Identifizierung der CA2-Region (siehe 3.2.2) wurde mit Hilfe der Steuerungssoftware dieselbe markiert. Die CA2-Region wurde bis auf einen kleinen Steg komplett umfahren und in einem ersten Durchgang nicht komplett ausgeschnitten. Dieses Vorgehen wurde unter der Vorstellung entwickelt, dass das auf die Membran aufgezogene und dort getrocknete Gewebe im Verbund unter Spannung steht. Eine einmalige Freisetzung dieser Spannung würde ein gezieltes Auffangen im Deckel des darunter liegenden Tubes erheblich erschweren. So wurde die noch bestehende Gewebebrücke erst in einem zweiten Durchgang durchtrennt und die CA2-Region fiel meist in den, mit einer speziellen Vorrichtung fixierten, Tubedeckel. Unter dem Mikroskop wurde das erfolgreiche Auffangen des Gewebes stets visuell verifiziert, dann das Tube vorsichtig aus seiner Halterung genommen und zügig verschlossen, wobei es über seinen waagrecht gehaltenen Deckel geklappt wurde. Die Abbildung 3.3 stellt den Arbeitsschritt der Lasermikrodissektion eines Hippocampus beispielhaft dar.

### 3.5 Quantifizierung von mtDNA-Deletionen der CA2-Region mittels real time-PCR



Abbildung 3.2: Ablauf der Lasermikrodissektion: Auf dem mit einem Probenstisch und einem Laser ausgestatteten Mikroskop (1) kann mit der Steuerungssoftware auf dem Bildschirm der Zielbereich ausgewählt werden (2). Anschließend wird dieser durch einen hochfrequenten Diodenlaser ausgeschnitten (3) und fällt zur weiteren Bearbeitung in das darunter liegende Gefäß (4).

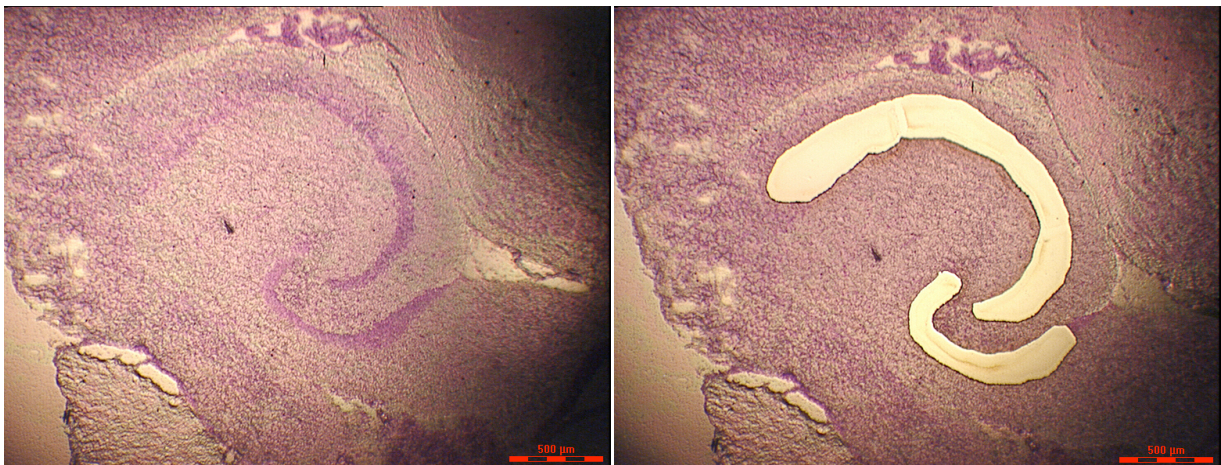


Abbildung 3.3: Darstellung des Hippocampus in 5facher Vergrößerung vor (links) und nach (rechts) der Durchföhrung der Lasermikrodissektion.

### 3.6 Darstellung von Deletionen der mtDNA von Hirn- und Muskelgewebe mittels long range-PCR

#### Isolierung der DNA

**Pyramidenzellen der CA2-Region des Hippocampus** Vor dem Beginn der Isolierung wurden die Tubes mit dem Zielgewebe für 5 min mit 15000 rpm zentrifugiert. Etwaiges noch im Deckel positioniertes Material kam so im Tube selbst zu liegen. Die DNA wurde mit dem QIAamp DNA Micro Kit für die Extraktion von DNA aus Micro dissektiertem Gewebe isoliert. Bei der Gewinnung der DNA wurde nach den Vorgaben des Herstellers (QIAamp DNA Micro Kit Handbook for purification of genomic DNA from laser-microdissected tissues, August 2003) verfahren. Die erhaltene DNA wurde in autoklaviertem  $H_2O$  gelöst. Die DNA wurde im Kühlschrank bei  $+6^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

**Durchführung der rtPCR** Da die Reaktion der rtPCR auch im Bereich hoher CT-Werte, also kleiner eingesetzter Mengen von Test-DNA nachweislich eine sehr gute Effizienz bewies, mussten keine weiteren Optimierungsschritte vorgenommen werden. Das für die Bestimmung von Deletionen aus Homogenat entwickelte Protokoll (siehe 3.4.2) konnte für die Quantifizierung von Deletionen aus Zellen der CA2-Region unverändert übernommen werden.

**Statistik** Für den Vergleich der Verumgruppe mit der Kontrollgruppe wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet.

### 3.6 Darstellung von Deletionen in der mtDNA von Hirn- und Muskelgewebe mittels long range-PCR

#### 3.6.1 Material

**Tiere** Die long range-PCR (lrPCR) wurde mit DNA aus Gehirn und Skelettmuskel durchgeführt. Für die Analyse der Deletionen aus Hirngewebe wurden  $n = 6$  Tiere der Verumgruppe und  $n = 5$  Tiere der Placebogruppe herangezogen, diese hatten ein Alter von 544–730 Tage erreicht. Die Untersuchung des Skelettmuskels wurde an  $n = 4$  mit Kreatin behandelten Tieren und  $n = 3$  Kontrolltieren vollzogen, ihr Alter betrug sich auf 648–730 Tage.

**Chemikalien und Verbrauchsmaterialien** Tabelle 3.15 zeigt die für die lrPCR gebrauchten Substanzen und Verbrauchsmaterialien mit deren Produkt-Nr. und Hersteller.

**Gerätschaften und Software** Die in Tabelle 3.16 aufgeführten Geräte wurden in dieser Arbeit für die Durchführung der lrPCR mit mtDNA benützt .



### 3.6 Darstellung von Deletionen der mtDNA von Hirn- und Muskelgewebe mittels long range-PCR

Tabelle 3.15: Für die lrPCR benötigte Verbrauchsmaterialien und Chemikalien mit deren Produkt-Nr. und Hersteller.

<b>Chemikalie / Verbrauchsmaterial</b>	<b>Produkt-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
QIAamp DNA Micro Kit	56304	Qiagen GmbH, Hilden (D)
Ultra Pure BSA	B9001S	BioLabs
Expand Long Template PCR System	04 829 042 001	Roche
DMSO	14000416	Sigma
Agarose	840004	Biozym Scientific GmbH
Gel Pilot 1kb Ladder	239085	Qiagen
Tube Strips 0,2ml	82-0266-A	Peqlab Biotechnologie GmbH
Ethidiumbromid	E1510-10ml	Sigma-Aldrich

Tabelle 3.16: Für die lrPCR benötigte Geräte und deren Software mit Produktbezeichnung und Hersteller.

<b>Gerät</b>	<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Thermal Cycler	PTC-200 Pettier Thermal Cycler	MJ Research
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Gelanalyse	Apagel Midi-Wide Biometra	Biomed Analytik GmbH
Ultraviolett Transluminator	46514	Peqlab Biotechnologie GmbH
Autoklav	Dampfsterilisator Varioklav 400	Thermo Scientific
Digitalkamera	E990	Nikon
Thermomixer compact	5350 2274	Eppendorf AG

### 3.6 Darstellung von Deletionen der mtDNA von Hirn- und Muskelgewebe mittels long range-PCR

#### 3.6.2 Methoden

**Isolierung der DNA** Das Isolieren der DNA aus dem Hirngewebe, Skelettmuskel und Blut erfolgte nach dem bereits unter 3.4.2 für die rtPCR beschriebenen Verfahren.

#### Long range PCR (lrPCR)

**Verwendete Primer und deren Sequenzen** Die in dieser Arbeit durchgeführte lrPCR amplifizierte die komplette, 16,3 kB umfassende mtDNA der Maus. Es wurden ein Long Expand Template PCR System und die in Tabelle 3.17 aufgeführten Kombinationen von Primern eingesetzt.

Tabelle 3.17: Für die Quantifizierung von Deletionen verwendete Primer und deren Sequenzen.

Primer	Primersequenz
<b>Paar 1</b>	
mtLrPCRfor1	TTT ATA GGC TAC GTC CTT CCA TGA GG (14520 - 14545)
mtLrPCRrev1	GGC AGG TAG GTC AAT GAA TGA GTG G (14207 - 14183)
<b>Paar 2</b>	
mtLrPCRfor2	GCA GGA GCA GGA ACA GGA TGA AC (5685 - 5707)
mtLrPCRrev2	TGC AGT ACC CAC TAT TCC CGC TC (5423 - 5401)
<b>Paar 3</b>	
mtLrPCRfor3	GCC GCT ACC CCA ATC CCT CC (13644 - 13667)
mtLrPCRrev3	GCG TCT GTT CGT CCG TAC CAT (12333 – 12313)

Wie aus Tabelle 3.17 ersichtlich wurden drei verschiedene Paare von Primern eingesetzt, deren Ansatzpunkte mit teilweise großem Abstand über die mtDNA verteilt waren. Dieses Vorgehen stützte sich auf folgende Überlegungen:

- Wie unter 3.4.2 erwähnt sind bestimmte Abschnitte der mtDNA statistisch häufiger von Deletionen betroffen als andere.
- Primer, die im Bereich einer Deletion ansetzten, können diese nicht detektieren da ihre Ansatzpunkte durch die Deletion verloren gehen und nur die DNA ohne Deletion amplifiziert wird. Die lrPCR ergäbe das Muster einer scheinbar intakten mtDNA.
- Um diesen methodischen Fehler zu vermeiden wurden mehrere über die mtDNA verteilte Angriffspunkte gewählt. Wenn ein Paar von Primern wegen einer Deletion ausfällt kann diese mit Hilfe eines anderen Paares erkannt werden.

### 3.6 Darstellung von Deletionen der mtDNA von Hirn- und Muskelgewebe mittels long range-PCR

**Protokoll der lrPCR** Das nachfolgende Protokoll (vergl. Tabelle 3.18) war für ein Gesamtreaktionsvolumen von 50,0  $\mu\text{l}$  ausgelegt. Je 2,0  $\mu\text{l}$  DNA-Lysat wurden in einer hot start PCR Reaktion mit einem Paar Primern amplifiziert, welche mit einer jeweils 0,3  $\mu\text{M}$  Endkonzentration zugesetzt wurden. Des weiteren wurden 2,5  $\mu\text{l}$  des beigefügten 10 $\times$ dNTP Mixes, 5,0  $\mu\text{l}$  Ultra Pure BSA, 5,0  $\mu\text{l}$  Expand Long Template Puffer 3, 3,75 U Expand Long PCR Enzym Mix pro Reaktion, 2,5  $\mu\text{l}$  DMSO und der Differenzbetrag an *ddH<sub>2</sub>O* zu einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  addiert.

Tabelle 3.18: Übersicht Reagenzien und die jeweils benötigte Menge für ein Reaktionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$ .

Reagenz	Menge Ansatz ND1 ( $\mu\text{l}$ )	Menge Ansatz ND4 ( $\mu\text{l}$ )
Master Mix 5 $\times$	4,0	4,0
Primer: mRTND1for	0,5	0
Primer: mRTND1rev	0,5	0
Probe: mRTND1	0,4	0
Primer: mRTND4for	0	0,5
Primer: mRTND4rev	0	0,5
Probe: mRTND4	0	0,4
H <sub>2</sub> O, PCR grade	9,6	9,6
DNA	5,0	5,0

Je nach Anzahl der auszuwertenden Proben ( $n_X$ ) wurden die benötigte Gesamtmengen ( $n_{Ges}$ ) für einen Ansatz berechnet. Um eventuelle Verluste durch Rückstände in Pipettenspitzen etc. auszugleichen, wurde jedem Ansatz ein zusätzliches Volumen zugefügt:  
 $n_{Ges} = (n_{Einzel} \cdot n_X) + 1$ .

**Protokoll des Thermal Cyclers** Der Thermal Cycler wurde für die Durchführung der hot start lrPCR mit folgendem Profil programmiert. Am Anfang der Reaktion stand ein Zyklus zur Denaturierung und Aktivierung der Enzyme von 93°C über 2 min. Anschließend folgten 25 Zyklen bestehend aus einem Schritt zur Denaturierung von 93°C für 10 s, einer Phase der Primer-Bindung von 30 s Dauer bei einer Temperatur von 59°C und der Elongation bei 68°C für 15 min + 10 s/Zyklus für die letzten 15 Zyklen. Abschluss war ein letzter Schritt der Extension über 7 min bei 68°C. Nach Ablauf des Protokolls wurde das PCR-Produkt in der Temperaturkammer bei 4 C gekühlt.

### 3.6 Darstellung von Deletionen der mtDNA von Hirn- und Muskelgewebe mittels long range-PCR

Tabelle 3.19: Darstellung des Thermal Cycler-Protokolls unter Berücksichtigung von Anzahl der Zyklen, deren Funktion, der Zieltemperatur und jeweiligen Zeitdauer.

Anzahl Zyklen	Funktion	Zieltemperatur (°C)	Dauer
<b>Aktivierung der Enzyme, Denaturierung</b>			
1	Denaturierung	93	2 min
<b>Amplifikation 1</b>			
10	Denaturierung	93	10 s
	Annealing	59	30 s
	Elongation	68	15 min
<b>Amplifikation 2</b>			
15	Denaturierung	93	10 s
	Annealing	59	30 s
	Elongation	68	15 min + 10 s / Zyklus
<b>Amplifikation 3</b>			
1	Letzte Elongation	68	7 min
<b>Kühlung</b>			
1	Kühlen	4	unendlich

**Negativkontrolle und Leerprobe** Als Negativkontrolle wurde wie bei der rtPCR aus Mauseblut isolierte DNA verwendet (siehe 3.4.2. Das für die lrPCR benötigte *ddH<sub>2</sub>O* wurde als Leerprobe wurde genutzt. Die Negativkontrolle und Leerprobe wurden in jedem Lauf der lrPCR gemeinsam mit der zu untersuchenden DNA bearbeitet.

**Analyse des lrPCR-Produktes** Von dem erhaltenen lrPCR-Produkt wurden 8  $\mu$ l entnommen, mit 4  $\mu$ l Blue Juice auf einem Streifen Parafilm aufgetragen und durch wiederholtes Aufziehen in die Pipettenspitze gut durchmischt. Mit dem erhaltenen Gemisch wurde ein 1 % Agarose-Gel (4  $\mu$ l Ethidiumbromid/100 ml Gel) geladen. Zur besseren Differenzierung der Banden wurden 2  $\mu$ l einer 1 kB DNA-Ladder aufgetragen. Über einen Zeitraum von 6 h wurde eine Spannung von 33 mV angelegt, das Ergebnis anschließend mit Hilfe eines UV-Schirmes und einer Digitalkamera dokumentiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Lipofuszingehalt der CA1- und CA2-Region des Hippocampus

Zusammenfassend ergab die Bildanalyse der Autofluoreszenz für die Tiere der Verumgruppe ( $n = 6$ ) einen deutlichen Trend ( $p = 0,06$ ; zweiseitiger T-Test) in Richtung einer Verminderung der Lipofuszin-Konzentration in der CA2-Region des Hippocampus im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n = 6$ ).

In der CA1-Region konnte ebenfalls ein Trend ( $p = 0,10$ ; zweiseitiger T-Test) zu einem verringerten Akkumulieren von Lipofuszin in der Kreatin-Gruppe verzeichnet werden.

Im Folgenden sind die evaluierten Flächenprozentsätze der einzelnen Tiere aus Verum- und Kontrollgruppe mit jeweiligem Mittelwert und der Standardabweichung aufgeführt und die Ergebnisse graphisch dargestellt (Abbildungen 4.1 und 4.3). Für die Methode der Quantifizierung mittels Analyse-Software ergab sich als mittlere Standardabweichung ein Wert von 0,57 Flächenprozent.

Die Ansammlungen von Lipofuszingranula waren in beiden Gruppen in der CA1-Region deutlich weniger stark ausgeprägt als in der CA2-Region des Hippocampus.

- Verumgruppe CA1/CA2 in Flächenprozent:  $3,55 \pm 2,07$  versus  $13,22 \pm 6,80$  ( $p = 0,0076$ ; zweiseitiger T-Test)
- Kontrollgruppe CA1/CA2 in Flächenprozent:  $5,93 \pm 2,49$  versus  $19,67 \pm 3,11$  ( $p = 7,25 \times 10^{-6}$ ; zweiseitiger T-Test)

**Lipofuszingehalt der CA1-Region** Die gemessenen Werte sind mit Mittelwert und erster Standardabweichung in Tabelle 4.1 dokumentiert und als Balkendiagramm in Abbildung 4.1 veranschaulicht.

**Lipofuszingehalt der CA2-Region** Im Vergleich zur CA1-Region wurde eine vermehrte Akkumulation von Lipofuszin in den Neuronen der Pyramidenzellschicht der CA2-Region des Hippocampus beobachtet und auch der Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen war deutlicher ausgeprägt.

Das durch die Gabe von Kreatin deutlich verminderte Akkumulieren von Lipofuszin in der CA2-Region wird in Abbildung 4.2 beispielhaft verdeutlicht. Dieser subjektive Eindruck wurde durch die objektiven Werte der Bildanalyse bestätigt und in Tabellenform (4.2) und als Grafik (4.3) dokumentiert. Bei Betrachtung der Ergebnisse der CA2-Region fällt in der Gruppe der Tiere mit Gabe von Kreatin bei einem Tier ein sehr hoher Wert auf. Diesem ist die relativ hohe Standardabweichung in der Verumgruppe zuzuschreiben.

#### 4.1 Lipofuszingehalt der CA1- und CA2-Region des Hippocampus

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Quantifizierung von Lipofuszin mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung für die CA1-Region des Hippocampus. Die Werte entsprechen dem gemessenen Anteil von Lipofuszin an der untersuchten Gesamtfläche (AOI).

Auswertung CA1-Region (Flächenprozent)		
Tier-Nr.	Verum	Kontrolle
1	5,01	4,64
2	5,58	4,27
3	0,85	4,88
4	2,22	10,89
5	2,09	4,99
6	5,53	5,89
<b>Mittelwert</b>	<b>3,55</b>	<b>5,93</b>
<b>1. Standardabw.</b>	<b>2,07</b>	<b>2,49</b>
Varianz	4,27	6,19
Faktor	1,67	
<b>T-Test (zweiseitig)</b>	<b>p = 0,10</b>	

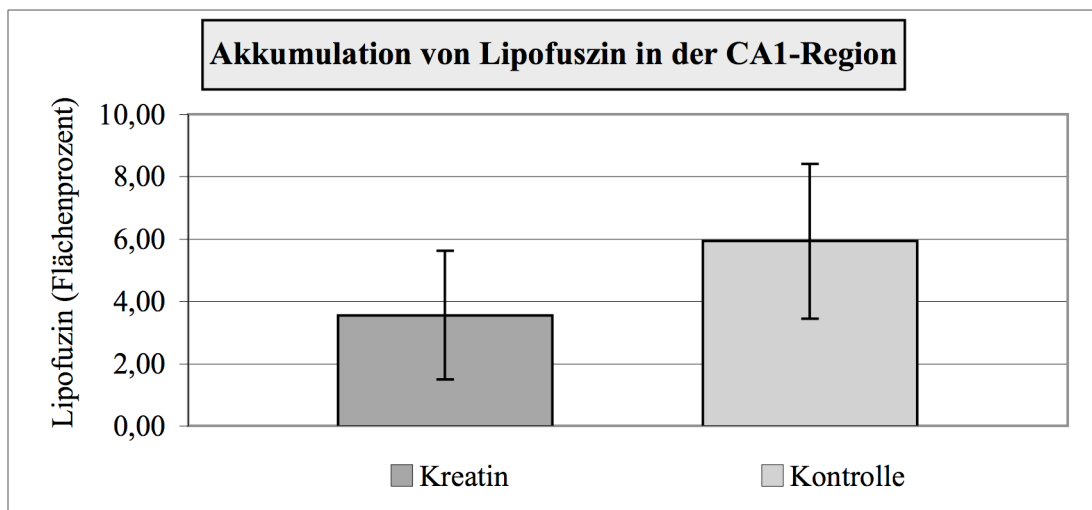


Abbildung 4.1: Darstellung der gemessenen Lipofuszin-Flächenprozentanteile der CA1-Region mit der ersten Standardabweichung in Form eines Balkendiagramms.

#### 4.1 Lipofuszingehalt der CA1- und CA2-Region des Hippocampus

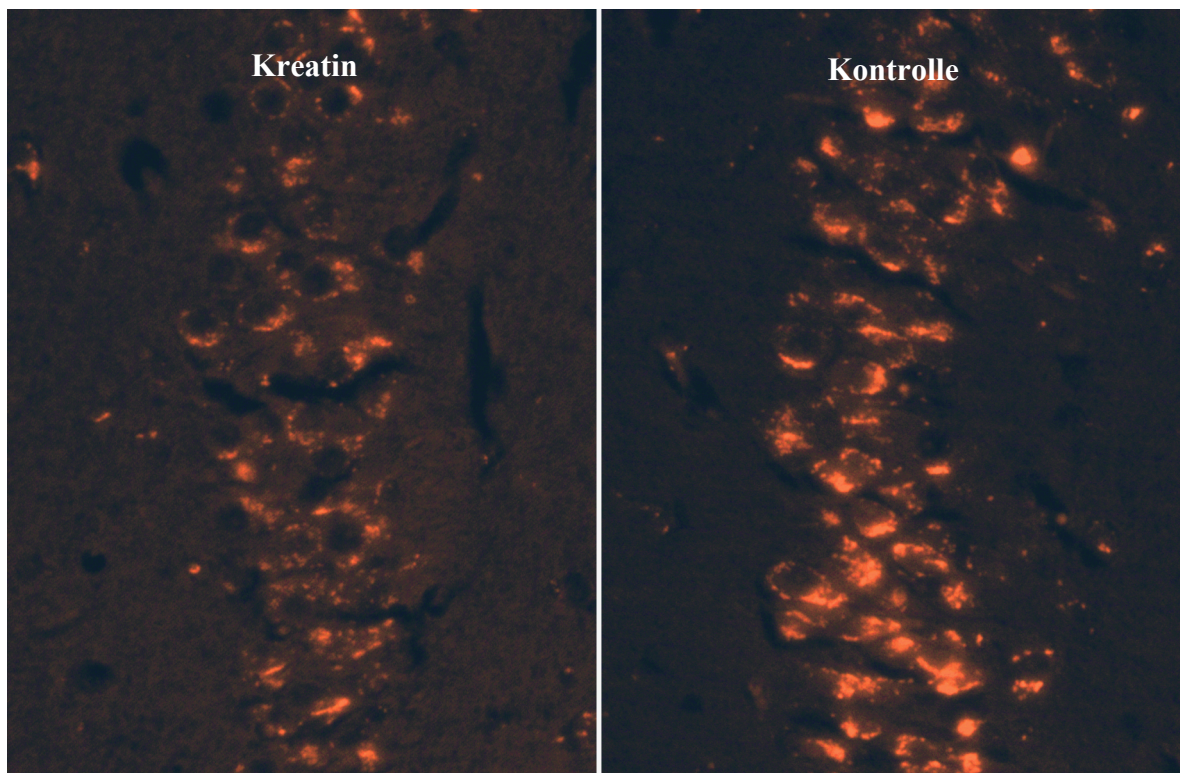


Abbildung 4.2: Für die jeweiligen Gruppen typische, mit Hilfe eines Rhodamin-Filters dargestellte Ansammlung von Lipofuszin-Granula in der CA2-Region des Hippocampus. Bei dem nicht behandelten Tier fällt eine deutlich stärker ausgeprägte Autofluoreszenz auf.

#### 4.1 Lipofuszingehalt der CA1- und CA2-Region des Hippocampus

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Quantifizierung von Lipofuszin mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung für die CA2-Region des Hippocampus. Die Werte entsprechen dem gemessenen Anteil von Lipofuszin an der untersuchten Gesamtfläche (AOI).

<b>Auswertung CA2-Region (Flächenprozent)</b>		
<b>Tier-Nr.</b>	<b>Verum</b>	<b>Kontrolle</b>
1	11,81	21,63
2	17,98	21,75
3	7,29	21,79
4	8,25	17,74
5	9,30	14,17
6	24,68	20,95
<b>Mittelwert</b>	<b>13,22</b>	<b>19,67</b>
<b>1. Standardabw.</b>	<b>6,80</b>	<b>3,11</b>
Varianz	46,25	9,67
Faktor	1,49	
<b>T-Test (zweiseitig)</b>	<b>p = 0,06</b>	

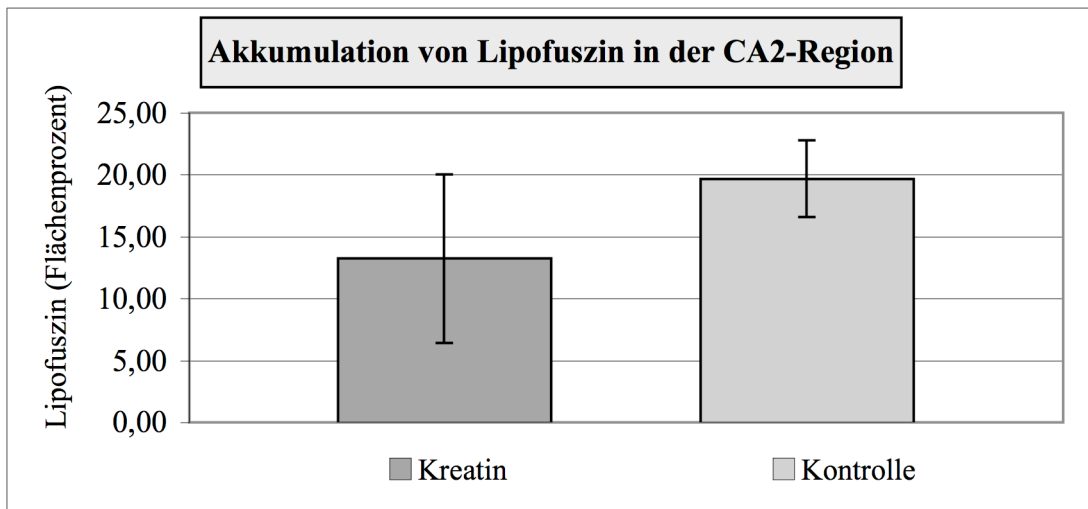


Abbildung 4.3: Darstellung der gemessenen Lipofuszin-Flächenprozentanteile der CA2-Region mit der ersten Standardabweichung in Form eines Balkendiagramms.



## 4.2 COX-negative Zellen in der COX/SDH-Färbung

In der histologische Untersuchung von repräsentativen, COX/SDH-gefärbten Schnitten konnten wider Erwarten keine COX-defizienten Zellen, weder im Hippocampus noch in anderen Hirnregionen, identifiziert werden. Einige wenige bläuliche Verfärbungen erwiesen sich durchweg als Artefakte.

Um die regelrechte Funktion der angewendeten, enzymatischen COX/SDH-Färbung zu verdeutlichen, sind nachfolgend Ausschnitte der auf den gleichen Objektträger aufgezogenen Positivkontrollen abgebildet. COX-negative Muskelfasern sind hier einwandfrei identifizierbar. Anbei beispielhafte Aufnahmen von histologischen Präparaten: Bilder des als Positivkontrolle verwendeten menschlichen Muskels (siehe Abbildung 4.4) und des Hirns der Maus (siehe Abbildung 4.5).

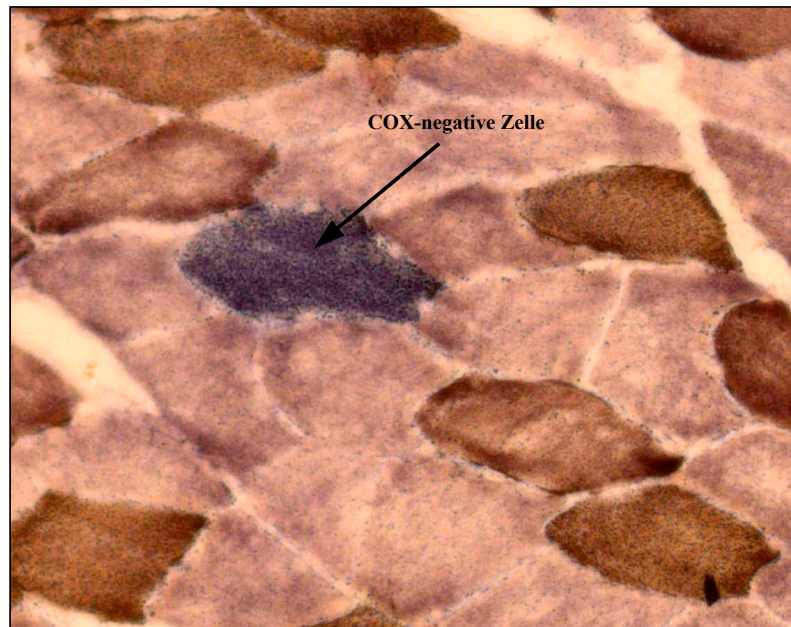


Abbildung 4.4: Digitale Aufnahme einer typischen Positivkontrolle. Deutlich zu erkennen die blauen, COX-negativen Muskelfasern. Verwendet wurde ein 10  $\mu\text{m}$  dicker Querschnitt durch den Muskel eines CPEO-Patienten. Die Kontrollen befanden sich auf dem gleichen Objektträger wie die Gefrierschnitte des Mausehirns, eine exakt gleiche Prozessierung der Schnitte war somit gewährleistet.

#### 4.3 real time-PCR mit DNA von Pyramidenzellen der CA2-Region, Muskel- und Hirnhomogenat

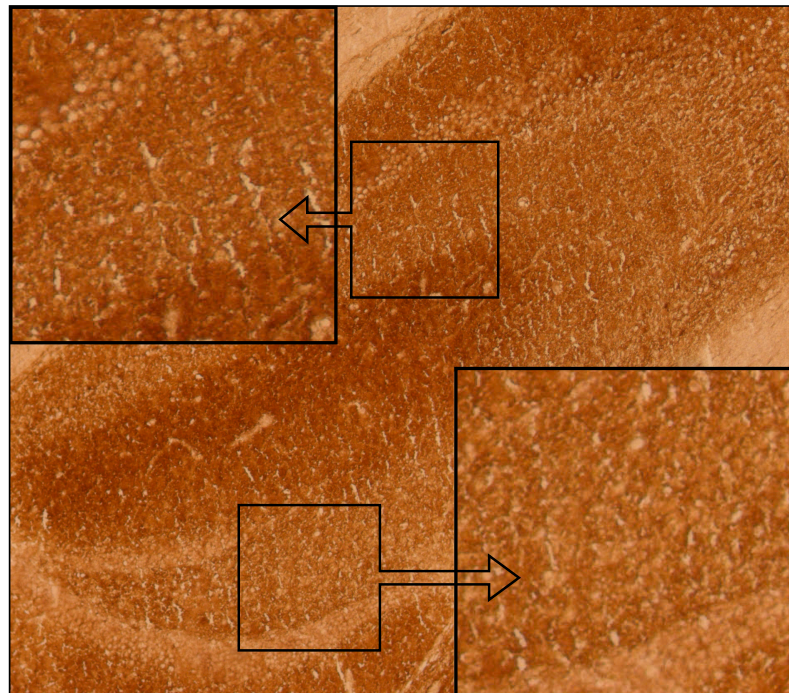


Abbildung 4.5: Repräsentative digitale Aufnahme eines histologischen Präparates, zusammengesetzt aus zwei Bildern mit 40facher Vergrößerung. Dargestellt ist ein COX/SDH-gefärbter, 10  $\mu\text{m}$  dicker Schnitt in der Sagittalebene mit Abschnitt des Hippocampus. Es sind keine COX-defizienten Zellen zu erkennen.

### 4.3 real time-PCR mit DNA von Pyramidenzellen der CA2-Region, Muskel- und Hirnhomogenat

**Muskelhomogenat** Die Quantifizierung der Deletionen in der mtDNA des Skelettmuskels mit der rtPCR ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe ( $p = 0,79$ ). In der Verumgruppe waren  $13,27 \pm 0,36\%$  der mtDNA von Deletionen betroffen, in der Kontrollgruppe  $13,58 \pm 1,96\%$ . Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Messwerte aufgelistet (Tab. 4.3) und graphisch als Balkendiagramm dargestellt (Fig. 4.6).

**Hirnhomogenat** Die Analyse der mtDNA aus Hirnhomogenat ergab signifikant weniger Deletionen in der Verumgruppe. ( $-1,55 \pm 2,94\%$  Verum versus  $6,8 \pm 3,76\%$  Kontrolle;  $p = 0,004$ ). Die Ergebnisse fielen für beide Gruppen deutlich geringer aus als erwartet. Teilweise war der ND1-Anteil der Proben sogar höher als der von ND4. Dies und die deutlich höhere Varianz der Methode für das Hirngewebe erklären die teilweise negativen Werte für den Prozentanteil der Deletionen. Nachfolgend sind die Ergebnisse in der Tabelle (Tab. 4.4)

#### 4.3 real time-PCR mit DNA von Pyramidenzellen der CA2-Region, Muskel- und Hirnhomogenat

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Muskelhomogenat. Angegeben ist der Prozentanteil der mtDNA, welcher von Deletionen betroffen ist, mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung. Jede Probe wurde dreimal gemessen.

Deletionen der mtDNA des Skelettmuskels (Prozent)								
Tier-Nr.	Verum				Kontrolle			
Messung Nr.	1	2	3	MW	1	2	3	MW
1	14,54	10,29	13,85	12,89	12,74	11,53	12,64	12,30
2	15,72	13,85	10,29	13,29	20,26	15,13	2,4	12,60
3	10,29	19,15	11,42	13,62	16,30	12,74	18,49	15,84
<b>Mittelwert</b>	<b>13,27</b>				<b>13,58</b>			
<b>1. Standardabw.</b>	<b>0,36</b>				<b>1,96</b>			
Varianz	0,36				1,96			
Mittlere Standardabweichung der Quantifizierungsmethode: 3,77								
<b>T-Test (zweiseitig)</b>	<b>p = 0,79</b>							

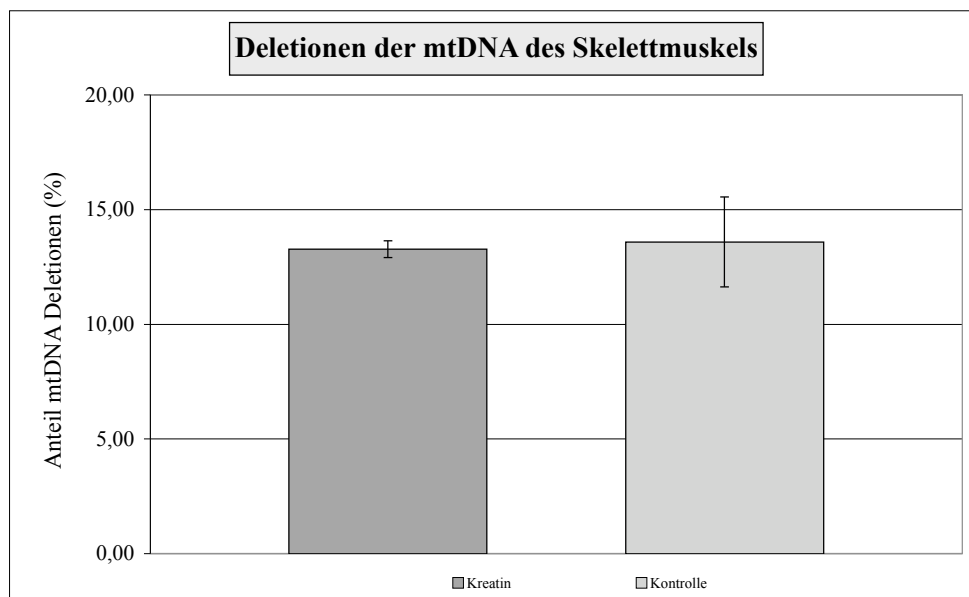


Abbildung 4.6: Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Muskelhomogenat, dargestellt als Balkendiagramm. Angegeben ist der Anteil der mtDNA in Prozent, welcher von Deletionen betroffen ist, mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung.

#### 4.3 real time-PCR mit DNA von Pyramidenzellen der CA2-Region, Muskel- und Hirnhomogenat

aufgeführt und als Balkendiagramm dargestellt (Fig. 4.7).

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Hirnhomogenat. Angegeben ist der Prozentanteil der mtDNA, welcher von Deletionen betroffen ist, mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung.

<b>Deletionen der mtDNA aus Hirnhomogenat (Prozent)</b>		
<b>Tier-Nr.</b>	<b>Verum</b>	<b>Kontrolle</b>
1	-2,10	7,34
2	-5,70	9,87
3	2,06	1,38
4	1,38	8,62
5	-1,40	
6	-3,53	
<b>Mittelwert</b>	<b>-1,55</b>	<b>6,80</b>
<b>1. Standardabw.</b>	<b>2,94</b>	<b>3,76</b>
Varianz	8,62	14,14
<b>T-Test (zweiseitig)</b>	<b>p = 0,004</b>	

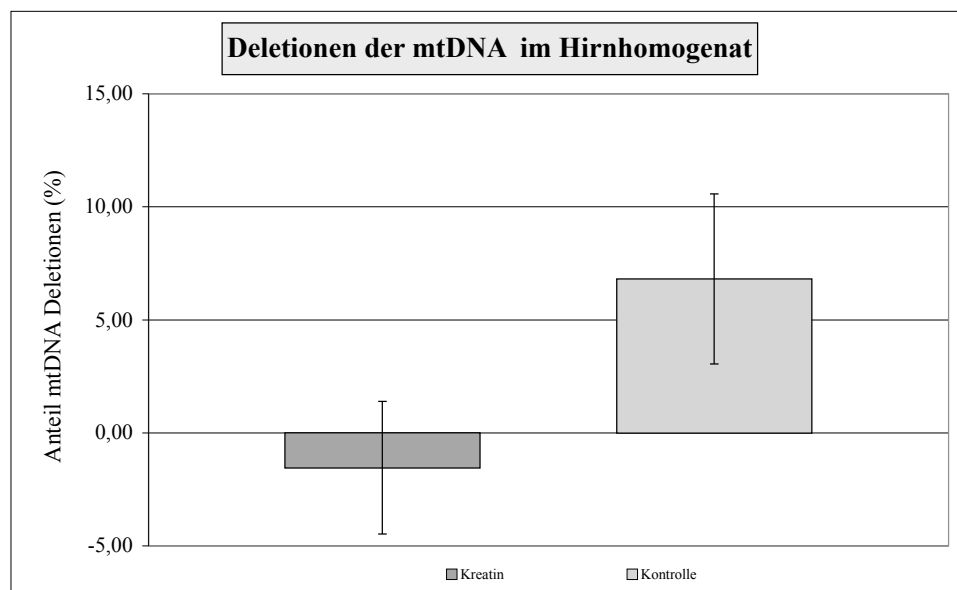


Abbildung 4.7: Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA aus Hirnhomogenat, dargestellt als Balkendiagramm. Angegeben ist der Anteil der mtDNA in Prozent, welcher von Deletionen betroffen ist, mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung.

#### 4.3 real time-PCR mit DNA von Pyramidenzellen der CA2-Region, Muskel- und Hirnhomogenat

**Pyramidenzellen der CA2-Region** Die Durchführung der rtPCR mit DNA der CA2-Region des Hippocampus ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,66$ ) hinsichtlich des Auftretens von Deletionen. In der Verumgruppe fanden sich  $6,78 \pm 8,21$  % Deletionen, in der Gruppe der Kontrolltiere  $4,40 \pm 3,76$  %. Da extrem wenig DNA eingesetzt wurde, stieg die Varianz der Methode wie erwartet erheblich an. So können auch die rechnerisch negativen Deletionswerte erklärt werden, für die aber höchstwahrscheinlich kein molekulares Korrelat existiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.5 und Fig. 4.8 dargestellt.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA von Pyramidenzellen der CA2-Region. Angegeben ist der Prozentanteil der mtDNA, welcher von Deletionen betroffen ist, mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung.

<b>Deletionen der mtDNA der CA2-Region (Prozent)</b>		
<b>Tier-Nr.</b>	<b>Verum</b>	<b>Kontrolle</b>
1	1,38	14,74
2	14,14	-4,24
3	14,74	1,38
4	-4,25	-6,44
5	7,89	12,34
6		8,62
<b>Mittelwert</b>	<b>6,78</b>	<b>4,40</b>
<b>1. Standardabw.</b>	<b>8,21</b>	<b>9,94</b>
Varianz	67,39	77,81
<b>T-Test (zweiseitig)</b>	<b>p = 0,66</b>	

#### 4.4 long range-PCR mit DNA aus Hirn- und Muskelhomogenat

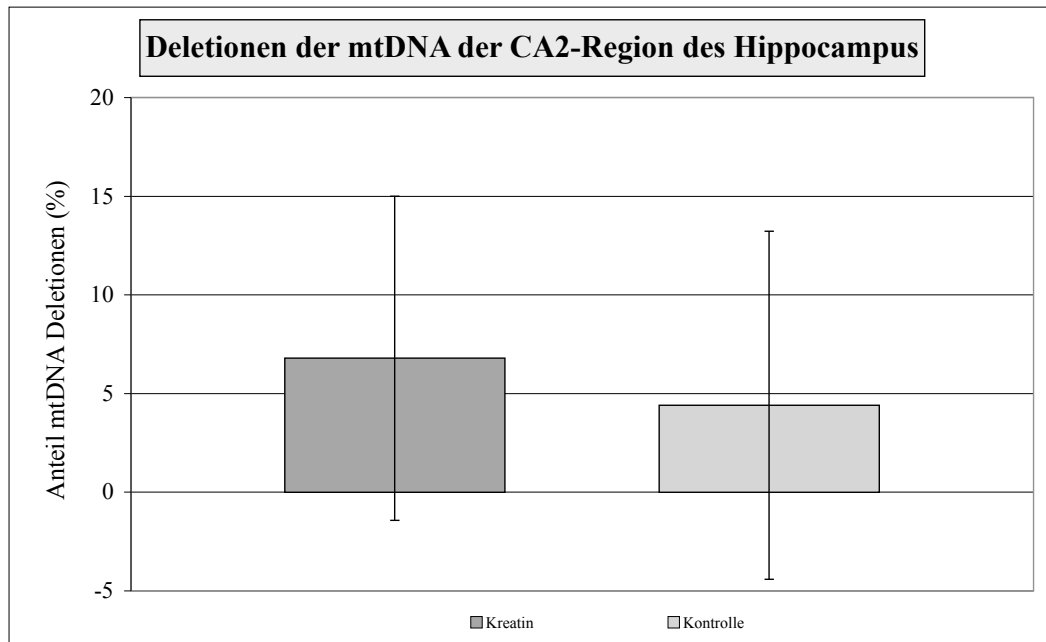


Abbildung 4.8: Ergebnisse der Quantifizierung von Deletionen der mtDNA von Pyramidenzellen der CA2-Region, dargestellt als Balkendiagramm. Angegeben ist der Anteil der mtDNA in Prozent, welcher von Deletionen betroffen ist, mit Mittelwert und der ersten Standardabweichung.

#### 4.4 long range-PCR mit DNA aus Hirn- und Muskelhomogenat

Mit der Methode der lrPCR konnten weder in der DNA des Gehirns noch des Muskels eindeutige Hinweise auf Deletionen festgestellt werden. Deletionen wären bei dieser Methode als zusätzliche Banden im DNA-Produkt aufgefallen. Es konnte jedoch nur die 16,3 kB Bande der gesamten mtDNA nachgewiesen werden, welche in der nachfolgenden Abbildung 4.9 gut zu erkennen ist und sich bei allen verwendeten Primer-Paaren zeigte.

#### 4.4 long range-PCR mit DNA aus Hirn- und Muskelhomogenat

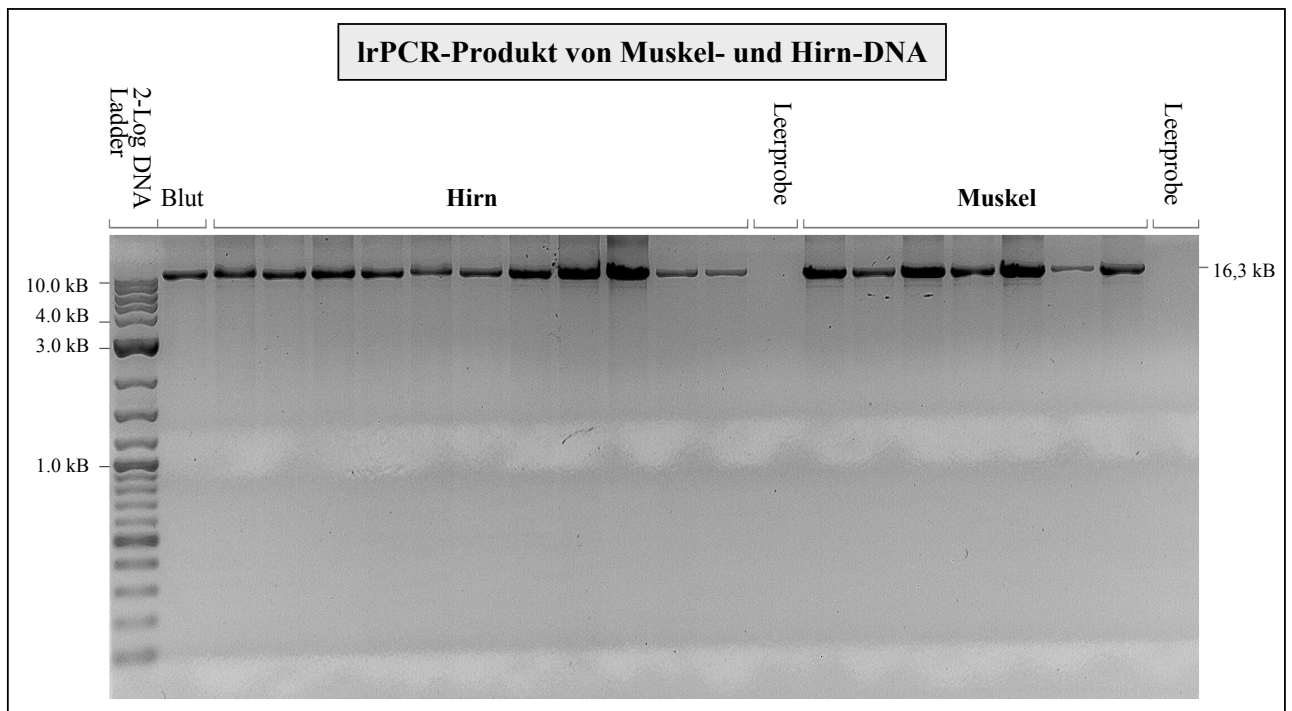


Abbildung 4.9: Produkt der Long Range PCR von Gehirn (544-730 Tage) und Skelettmuskel (648-730 Tage), aufgetragen auf ein 1% Agarose Gel. Die 16,3 kB Bande, welche Korrelat einer vollständig amplifizierten mtDNA ist, kann man in sämtlichen untersuchten Proben gut erkennen. Zusätzliche Banden, welche vor der 16,3 kB Bande zu erwarten wären und für Deletionen sprächen, sind nicht auszumachen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik

#### 5.1.1 Lipofuszin

##### Verminderter Lipofuszingehalt in der CA1- und CA2-Region des Hippocampus nach Kreatingabe

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der deutliche Trend zu einem geringeren Akkumulieren von Lipofuszin im Hippocampus in der CA1-Region und noch stärker ausgeprägt in der CA2-Region, als Folge einer langfristigen oralen Supplementation mit Kreatin. Die Auswirkungen einer langfristigen Gabe von Kreatin auf die Entstehung von Lipofuszin in Neuronen des Hippocampus wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Das verminderte Anfallen von Lipofuszin steht im Einklang mit anderen Teilergebnissen der CreaLife-Studie und kann als morphologisches Korrelat einer verlängerten gesunden Überlebenszeit gewertet werden. Bedingt durch die von Natur aus geringe Akkumulation von Lipofuszin in der CA1-Region erreichte der Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen kein signifikantes Niveau, obwohl der gemessene Lipofuszingehalt in der Kontrollgruppe um den Faktor 1,67 erhöht war. Dank der insgesamt stärkeren Ausprägung der Akkumulation von Lipofuszin in den Neuronen der Pyramidenzellschicht der CA2-Region des Hippocampus fiel der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen deutlicher aus als in der CA1-Region.

Der Nachweis der verringerten Produktion von Lipofuszin gibt auch Hinweise hinsichtlich des Mechanismus der lebensverlängernden Wirkung von Kreatin. Höchstwahrscheinlich steht die Modulation des oxidativen Stresses im Vordergrund, welcher auch bei der Entstehung von Lipofuszin eine zentrale Rolle spielt und für den physiologischen Alterungsprozess mit verantwortlich gemacht wird. Auch der beobachtete Trend zu einem verminderten Anfallen eines bedeutenden Markers für oxidativen Stress, 8-OHdG, weist in diese Richtung. Ob sich die antioxidative Wirkung von Kreatin über eine postulierte Ökonomisierung der Atmungskette oder die Induktion von Genen entfaltet, kann durch die Ergebnisse der Lipofuszinmessung nicht geklärt werden. Allerdings stützen die vorliegenden Ergebnisse die FRTA und die Theorie über die mitochondriale-lysosomale Achse des Alterns, in welcher die Akkumulation von Lipofuszin neben freien Radikalen als ursächlicher Mechanismus für das zelluläre Altern angesehen wird [81].

Sehr wahrscheinlich führt ein erhöhter intralysosomaler Lipofuszingehalt über verschiedene Mechanismen zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Zelle [173, 232]. Eine zunehmende funktionelle Beeinträchtigung auf zellulärer Ebene ist auch die Ursache für die beschriebene Abnahme kognitiver Fähigkeiten im höheren Lebensalter, die sicherlich auf altersassoziiert-



## 5.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik

te Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene zurückgeführt werden kann. Ein in diesem Zusammenhang wichtiger anatomischer Fokus ist der Hippocampus. Er scheint bei kognitiven Funktionen, insbesondere Gedächtnisleistungen und Lernvorgängen, eine herausragende Rolle zu spielen. Im Tiermodell führte die Langzeiteinnahme von Kreatin neben einem geringeren Akkumulieren von Lipofuszin im Hippocampus zu einer signifikanten Verbesserung der Gedächtnisleistung behandelter Tiere. Ein Zusammenhang zwischen dem Lipofuszingehalt des Hippocampus und dem Abschneiden der Tiere bei der Testung der Objektwiedererkennung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht. Eine mögliche Interaktion von Kreatin und Gedächtnis über eine verminderte funktionelle Einschränkung der Zelle durch eine verminderte Akkumulation von Lipofuszin wäre aber durchaus denkbar.

Ein weiteres interessantes Phänomen ist die hohe Varianz der Kreatinkonzentration im Serum der Tiere, welche sich möglicherweise auch in den hohen Werten des Lipofuszingehalts mancher Tiere der Verumgruppe widerspiegelt und ein Hinweis auf "non-responder" einer oralen Gabe von Kreatin bei der Maus in Analogie zum Menschen sein könnte.

### **Methode der Quantifizierung von Lipofuszin**

Ziel der Untersuchung war die Frage, ob die intralysosomale Akkumulation von Lipofuszin als Konsequenz einer langfristigen Gabe von Kreatin in Pyramidenzellen des Hippocampus verändert wird. Diese Fragestellung kann mit unterschiedlichen Darstellungs- und Auswertungsmethoden bearbeitet werden.

**Wahl der Darstellungsmethode** Lipofuszin ist mit diversen histochemischen Färbungen, fluoreszenzmikroskopisch, elektronenmikroskopisch, im Durchflusszytometer (FACS) und in der Spektrofluorometrie nachweisbar. Allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Spezifität, Reliabilität und Variabilität der genannten Verfahren.

Histochemische Methoden beinhalten folgende Färbetechniken: Neutralrot-Färbung (Fette), Gentaviolett, Schmorl'sche Reaktion, Indophenol, Färbung nach Hueck, alternative Nil-Blau-Färbung, Chrom-Aluminium-Hämatoxylin-Färbung, PAS-Färbung und die Sudan Black B-Färbung [233, 234, 235, 236, 237]. Nachteil dieser Färbungen ist die oft mangelhafte Spezifität und der Verlust der für Lipofuszin charakteristischen Autofluoreszenz. Auch die Auswertung der histologischen Präparate ist zeitintensiv.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen detaillierte Aussagen über die Lokalisation der Ablagerung und die Morphologie, aber wiederum keine über die Autofluoreszenz zu. Sie sind sehr aufwendig und erlauben nur die Beschreibung eines relativ kleinen Ausschnitts, was die Quantifizierung deutlich erschwert.

Nachteil einer Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie ist die mangelnde Differenzierung zwischen Lipofuszin, Ceroiden sowie nicht näher spezifizierten Autofluoreszenzen und die erhebliche Ungenauigkeit der Methode [238]. Gleiches gilt auch für die Spektrofluorometrie, bei welcher kein Zusammenhang zwischen der gemessenen Intensität und dem Gehalt an Lipofuszin nachgewiesen werden konnte. Auch die Wellenlänge der quantifizierten gelösten Substanzen stimmte nicht mit der von Lipofuszin überein, was sicherlich auch

## 5.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik

daran liegt, dass eine seiner wichtigsten Eigenschaften gerade seine schlechte Löslichkeit ist [238, 173]. Die Durchflusszytometrie und die Spektrofluorometrie können zusammenfassend als Methode zur Quantifizierung von Lipofuszin ungeeignet bezeichnet werden.

Ein sehr spezifischer und präziser Nachweis erfolgt über die fluoreszenzmikroskopische Analyse seiner spezifischen Autofluoreszenz. Diese erfordert einen erheblichen Zeitaufwand und die “Blindung“ des Untersuchers, stellt aber bei Beachtung einiger Grundregeln der Fluoreszenzanalyse (siehe Kapitel 3.2.2) die derzeit beste Methode dar [238, 239].

**Softwaregestützte Bildanalyse** In vielen Publikationen erfolgt die Quantifizierung von Lipofuszin semiquantitativ. Entweder es werden die Neuronen gezählt, in welchen Lipofuszin-Granula vorhanden sind und diese werden auf die Gesamtzahl von Neuronen bezogen, oder aber es wird in mehrere Gruppen unterteilt, von “sehr wenig Lipofuszin vorhanden“ bis “viel Lipofuszin vorhanden“. Diese relativ ungenaue und sehr subjektive Bestimmung des Lipofuszingehalts war für die vorliegende Arbeit unzureichend. Deshalb wurde mit Hilfe der Bildanalyse-Software Image Pro Plus Version 5.0 ein Algorithmus zur Auswertung von Digitalaufnahmen entwickelt. Die erhaltenen Ergebnisse erwiesen sich nach der Optimierung der Methode als äußerst präzise und gut reproduzierbar. Nachteil war einzig der erhebliche zeitliche Aufwand, da eine Automatisierung des Auswertungsprozesses nicht möglich ist und dieser manuell durchgeführt werden muss (siehe Kapitel 3.2.2).

**Problematik in der Darstellung und Auswertung der Autofluoreszenz** Lipofuszin ist ein sehr instabiles Fluorophor, welches in angeregtem Zustand schnell ausbleicht bzw. verblasst. Daher ist das akkurate Einhalten des Protokolls bei der Generierung digitaler Aufnahmen obligat. Aufgrund erheblicher Manipulationsmöglichkeiten sollte die Auswertung der Aufnahmen auf jeden Fall geblindet erfolgen. Auch hier sollte das Analyseprotokoll eingehalten werden und die Auswertung innerhalb eines kurzen Zeitraums durch einen Untersucher erfolgen.

### 5.1.2 COX-defiziente Zellen

#### Kein Nachweis COX-negativer Zellen

Der fehlende Nachweis COX-defizienter Zellen im Gehirn der Maus kann unterschiedliche Ursachen haben: COX-negative Zellen sind im Gehirn der Maus nicht bzw. nur äußerst selten vorhanden, oder die angewandte Methode ist für deren Nachweis nicht geeignet. Da die COX/SDH-Färbung systematisch optimiert wurde und COX-defiziente Zellen bei den auf den gleichen Objektträgern aufgezogenen Positivkontrollen einwandfrei identifizierbar waren, ist eine methodische Ursache nahezu ausgeschlossen. Als wahrscheinliche Erklärung ist vielmehr ein sehr seltenes Auftreten COX-defizienter Zellen in Gehirnen von C57BL/6J-Mäusen in der analysierten Altersgruppe anzunehmen. In einem Tiermodell mit dem Phänotyp der beschleunigten Alterung fanden sich vermehrt Punktmutationen und

## 5.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik

Deletionen. Diese waren mit dem Nachweis COX-negativer Neurone und Myozyten assoziiert [240]. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Kreatingabe bei Wildtypmäusen und somit den physiologischen Alterungsprozess. In dem verwendeten Tiermodell scheint die funktionelle Einschränkung der COX eine untergeordnete Rolle zu spielen. Jedenfalls eignet sich die Quantifizierung COX-negativer Zellen in dem vorliegenden Tiermodell nicht als Parameter für das Altern und die oxidative Schädigung bzw. dadurch entstandene funktionelle Einschränkungen des Gesamtorganismus.

### **Methode der Darstellung COX-negativer Neurone**

Ziel der Untersuchung war die Enzym-histochemische Darstellung möglicher, mit zunehmendem Alter auftretenden funktionellen Einschränkungen der Zelle. Beim Menschen ist der Nachweis COX defizienter Zellen mit Hilfe der COX/SDH-Färbung für Muskel- und Hirngewebe ein gut etabliertes Verfahren. In Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen wurde das Auftreten COX-negativer Zellen beschrieben [241, 242, 240]. Bei Wildtypmäusen wurden in den meisten Fällen keine COX-negativen Zellen gefunden, vor allem nicht in Geweben wie Muskel oder Gehirn, welche im Alterungsprozess eine bedeutende Rolle spielen [240]. In unserer Arbeitsgruppe konnten allerdings einige wenige COX-defiziente Neurone bei sehr alten Wildtypmäusen (Alter über 36 Monate) nachgewiesen werden.

**Wahl der Darstellungsmethode** COX-defiziente Zellen sind der direkte Nachweis einer funktionellen Störung der Zelle und gelten als indirekter Hinweis auf einen hohen Grad mitochondrialer Deletionen [59]. Eine früher weit verbreitete Form des Nachweises COX-defizienter Zellen war die einfache COX-Färbung von Gefrierschnitten. COX-defiziente Zellen färbten sich im Gegensatz zum umliegenden Gewebe nicht an und fielen als weiße Aussparungen im histologischen Präparat auf. Bei einem häufigen Vorkommen und relativ großen betroffenen Arealen, wie beispielsweise im Muskelgewebe, reichte diese Methode der Darstellung aus. Bei wenigen und kleinen COX-negativen Zellen wie Neuronen ist eine zuverlässige Quantifizierung mit der alleinigen COX-Färbung allerdings kaum möglich. Erst die Kombination mit einer zweiten Färbung, der SDH-Färbung, erlaubt präzise Aussagen über deren Vorkommen und Anzahl, da auch einzelne, kleine Zellen gut auszumachen sind. Die von der COX-Färbung ausgesparten COX-defizienten Zellen färben sich im zweiten Schritt der SDH-Färbung dunkelblau an [59].

**Problematik in der Darstellung COX-defizienter Neurone** Da die COX/SDH-Färbung eine enzymbasierte Methode ist, muss eine hohe Qualität des untersuchten Gewebes gewährleistet sein. Ansonsten ergibt sich eine braun-blaue Färbung des gesamten Schnittes und die Erkennung einzelner COX-negativer Zellen ist nicht möglich. Auch sollte eine Optimierung des Färbeprotokolls für unterschiedliche Gewebe und Schnittdicken

## 5.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik

vorgenommen werden. Strukturen, die auf digitalen Aufnahmen als COX-defiziente Zellen imponieren, sollten grundsätzlich am Mikroskop überprüft werden, um vermeintliche COX-defiziente Neuronen gegebenenfalls mit Hilfe der Ebenenbestimmung als Artefakte identifizieren zu können.

### 5.1.3 Deletionen der mtDNA

Die Ergebnisse der rtPCR lassen folgende Schlussfolgerungen zu: zum einen könnte der Grad der Deletionen der mtDNA bei der weiblichen C57BL/6J-Maus deutlich geringer als beispielsweise beim gealterten Menschen sein, zum anderen könnte eine andere Verteilung der Deletionen vorliegen und diese mit Primern für die ND1- und ND4-Region der mtDNA nicht messbar sein.

Im Hinblick auf den fehlenden Nachweis COX-defizienter Zellen, welche mit einem hohen Grad an deletierter mtDNA assoziiert sind, ist erstere Erklärungsmöglichkeit die wahrscheinlichere. Dies kann aber ohne eine Analyse der unterschiedlichen Deletionen durch Sequenzierung nicht mit vollkommener Sicherheit angenommen werden.

Eine weitere Erklärung könnte die Wahl der falschen Hirnregion gewesen sein. Der Hippocampus ist bei Untersuchung der Entstehung altersassoziiierter kognitiver Einschränkungen sicherlich eine viel versprechende Hirnregion. Beim Menschen war der Anteil von mtDNA mit Deletionen im Hippocampus in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unseres Tiermodells mit durchschnittlich 14-17% relativ gering. Besonders vulnerabel gegenüber oxidativem Stress und Folgeschäden wie mtDNA-Deletionen scheint aber insbesondere die *Substantia nigra* zu sein. Beim Menschen fanden sich hier deutlich mehr Deletionen. Möglicherweise hätte man in der *Substantia nigra* auch in diesem Tiermodell schon ein funktionell signifikantes Niveau an mtDNA-Deletionen nachweisen können.

Im Hirnhomogenat konnte mit der sensitiven rtPCR ein signifikant vermindertes Akkumulieren von Deletionen in der Verumgruppe beobachtet werden. Im Vergleich zu den Untersuchungen am Muskel war der Anteil der mtDNA mit Deletionen aber insgesamt deutlich geringer und weit von dem als funktionell relevant angesehen Anteil von etwa 65% entfernt [59]. Ursache für die Diskrepanz zwischen Muskel und Gehirn könnte die "Verwässerung" der Ergebnisse durch diverse andere mit untersuchte Zelltypen, wie beispielsweise Gliazellen im Hirnhomogenat, gewesen sein. Die Ergebnisse der rtPCR von einzelnen Neuronen zeigten dann auch wie erwartet einen etwas höheren Anteil an mtDNA-Deletionen.

Hinsichtlich der negativen Ergebnisse der lrPCR, welche zwar gut in das Gesamtbild der Ergebnisse passen, aber äußerst unwahrscheinlich sind, ist ein methodisches Versagen anzunehmen. Zwar gelang die ansonsten oft schwierige Amplifizierung der gesamten, 16,3 kB umfassende mtDNA, die in der Literatur beschriebenen Deletionen konnten aber nicht beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung könnte der Einsatz einer falsch hohen DNA-Konzentration und die Etablierung der Methode auf einem zu engen Spektrum an unterschiedlichen DNA-Konzentrationen gewesen sein.

Eine weitere, allerdings schlecht zu überprüfende Möglichkeit für positive Befunde in der Literatur könnte auch die artifizielle Schädigung der DNA durch unsachgemäße Lagerung

## 5.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik

gewesen sein. So gibt es Hinweise, dass beispielsweise das Einfrieren und Auftauen der Proben die Integrität der DNA beeinträchtigt und unter anderem zu Doppel- und Einzelstrangbrüchen führen kann [243]. Bestimmte Regionen der DNA könnten zudem für das Auftreten solcher Schäden besonders sensibel sein [244] und in der lrPCR als Deletionen imponieren. Diese Annahmen lassen sich durch eine retrospektive Analyse der Literatur allerdings nicht belegen, speziell die Anfälligkeit der lrPCR gegenüber verschiedenen Lagerungsbedingungen der Proben müsste experimentell geklärt werden.

**Deletionen, COX-negative Zellen und der Alterungsprozess** Beim Menschen wurde eine Korrelation zwischen einer erhöhten Last mitochondrialer Deletionen und der verminderten Aktivität der COX nachgewiesen [59]. Da die Zahl COX-negativer Zellen mit dem Alter zunimmt, wurde auf eine zentrale funktionelle Bedeutung von Deletionen bei neurodegenerativen Erkrankungen und dem physiologischen Altern geschlossen. Diese Hypothese wird durch das bekannte Tiermodell für akzelerierte Alterung, die so genannte *mutator mouse* gestützt [240]. Hier fanden sich bei der homozygoten PolgA-Mutante vermehrt Punktmutationen und Deletionen der mtDNA. Diese waren mit dem Nachweis COX-negativer Zellen als Hinweis für eine funktionelle Relevanz und einem schnell alternden Phänotyp mit verkürzter Überlebensdauer assoziiert. Hinsichtlich des betroffenen Gewebes und der Häufigkeit des Auftretens unterschieden sie sich allerdings von Veränderungen, wie man sie beispielsweise beim gealterten Menschen findet. Gegenüber dem Wildtyp waren die Mutationen und Deletionen um den Faktor zehn erhöht. Auch wenn eine exzessive Steigerung von mtDNA-Deletionen zu einer verkürzten Lebensdauer und dem Phänotyp der akzelerierten Alterung führt, bleibt deren Beitrag zum physiologischen Alterungsprozess weiterhin Gegenstand aktueller Diskussionen. Kritiker dieses Tiermodells weisen darauf hin, dass es mehrere andere Tiermodelle beschleunigter Alterung mit einem sehr ähnlichen Phänotyp gibt, bei denen aber kein vermehrtes Auftreten von mtDNA-Mutationen zu beobachten ist. Für sie ist das Tiermodell der *mutator mouse* ein nützliches Werkzeug, um den aus multiplen mtDNA-Mutationen resultierenden Phänotyp zu untersuchen. Aussagen über die Rolle von Deletionen der mtDNA im natürlichen Alterungsprozess lassen sich aber weder im positiven noch im negativen Sinne treffen [74].

Im vorliegenden Tiermodell könnte man von fehlenden COX-defizienten Zellen auf eine geringe funktionelle Bedeutung von Deletionen in der untersuchten Altersgruppe schließen. Andere Mechanismen, wie beispielsweise das Akkumulieren von Lipofuszin, wären dann bei der Maus stärker zu gewichten. Für diese Annahme sprechen auch eine deutlich geringere Prävalenz von Punktmutationen der mtDNA als lange angenommen [74], sowie die mangelnde Beeinträchtigung der Überlebenszeit durch deren gehäuftes Auftreten [164]. Inwieweit sich diese Beobachtungen bei der Maus auf den Menschen übertragen lassen, sei dahingestellt.

### Methoden der Messung von Deletionen

Beim Menschen wurde mehrfach die Detektion von Deletionen mit Hilfe der rtPCR und der lrPCR beschrieben. Für die Maus existierten bislang nur Ergebnisse für die lrPCR.

## 5.1 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse vor dem Hintergrund der angewandten Methodik

**Quantifizierung mit der rtPCR** Die Messung von Deletionen mit der rtPCR ist beim Menschen eine verlässliche Methode zur Erfassung von altersassoziierten, viele tausend Basenpaare betreffende Deletionen. Sie basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der Deletionen über die mtDNA. Ihr Ergebnis erlaubt eine Aussage darüber, wieviel Prozent der mtDNA in einem bestimmten Bereich von einer Deletion betroffen sind. Die Ergebnisse wurden beim Menschen durch bislang genutzte Verfahren, wie den Southern Blot, validiert und scheinen auch von funktioneller Relevanz zu sein. Ein Zusammenhang mit dem Alterungsprozess und bestimmten Pathologien wurde beschrieben [59].

**Problematik der Messung von Deletionen mit der rtPCR** Über die Anwendung dieser Methode bei der Maus liegen bislang noch keine Daten vor. Eine eingeschränkte Aussagekraft wäre durch eine sich vom Menschen unterscheidende Verteilung der altersassoziierten Deletionen denkbar. Auch muss die neu etablierte Methode bestimmten Anforderungen hinsichtlich der Effizienz der PCR-Reaktion und der Auswertung gerecht werden. Die für die vorliegende Arbeit etablierte rtPCR erfüllte diese Qualitätsmerkmale mit der hohen Effizienz der PCR-Reaktion von 95-96 % weit über das geforderte Maß hinaus.

**Quantifizierung mit der lrPCR** Ergebnis der lrPCR-Reaktion mit mtDNA ist meist die Amplifizierung der gesamten mtDNA und die Darstellung von Deletionen als kürzere Banden im PCR-Produkt. Eine Aussage über das Vorkommen verschiedener Typen von Deletionen ist möglich, eine Aussage über deren Anteil an der gesamten mtDNA jedoch nicht. Die lrPCR der mtDNA ist eine für Mensch und Maus etablierte Methode [63, 59].

**Problematik der Messung von Deletionen mit der lrPCR** Die regelrechte Darstellung der gesamten mtDNA ist oftmals schwer zu erreichen, da kürzere, von Deletionen betroffene DNA-Segmente vorzugsweise amplifiziert werden [63]. Eine Darstellung der 16,3 kB-Bande im PCR-Produkt spricht für eine ordnungsgemäße Funktion der rtPCR-Reaktion. Deletionen werden nicht von der lrPCR erfasst, wenn sie den Ansatzpunkt der Primer eliminieren. Um diesen methodischen Fehler zu vermeiden, sollten stets mehrere Primer-Paare mit entgegengesetzten Laufrichtungen verwendet werden. Um eine sichere Darstellung von Deletionen zu erreichen, sollte die zu untersuchende mtDNA in mehreren Verdünnungsstufen verwendet werden [63].

Damit eine Deletion mit der lrPCR als Bande dargestellt werden kann, muss diese eine gewisse Menge der untersuchten mtDNA betreffen, da das erhaltene Signal ansonsten für einen optischen Nachweis nicht ausreicht. Die Ergebnisse der rtPCR deuten auf einen geringen Anteil an mtDNA-Deletionen hin. Dieser erhöht sich im Laufe des Lebens über den noch nicht vollständig verstandenen Prozess der *klonalen Expansion*. Möglicherweise waren die untersuchten Tiere zu jung und der Anteil deletierter mtDNA-Moleküle für den Nachweis mit der lrPCR nicht hoch genug. Ein Nachweis hätte vielleicht mit einem zweiten Lauf der lrPCR im Sinne einer *nested PCR* gelingen können.

### 5.1.4 Relevanz des Tiermodells

Neben Nematoden und der Fruchtfliege sind Mäuse häufig genutzte Versuchstiere, um den Alterungsprozess und assoziierte Veränderungen zu untersuchen. Es liegt nahe anzunehmen, dass die dem Alterungsprozess zugrunde liegenden Mechanismen bei allen Spezies ähnlich sind, so auch bei Maus und Mensch. Unter anderem wurde die Akkumulation von Lipofuszin und Deletionen der mtDNA mit dem Alter für Mensch und Maus beschrieben [245, 59].

Wie bereits in Kapitel 1.7 erwähnt, ist Kreatin bei Sportlern ein sehr beliebtes Nahrungsergänzungsmittel, welches mit dem Ziel der Steigerung der körperlichen Leistungsfähigkeit meist im mittleren Lebensalter eingenommen wird. Eine therapeutische Gabe von Kreatin bei neurodegenerativen und altersassoziierten Erkrankungen würde ebenfalls im höheren Alter erfolgen. Diesem Aspekt wurde mit dem Beginn der Kreatindiät ab dem ersten Lebensjahr Rechnung getragen, die Applikation des Verums mit 2% der Nahrung entsprach der in Tiermodellen üblichen Dosierung. Wenn man eine durchschnittliche Nahrungsaufnahme von 4g/Tag und ein Gesamtkörpergewicht von 30 g zu Grunde legt, entspricht das einer Dosierung von 1,3 g Kreatin pro kg Körpergewicht. Somit liegt die Dosierung um den Faktor zehn höher als die beim Menschen übliche Gabe von 0,13 g/kg Körpergewicht [207]. Ein weiterer wichtiger Punkt der CreaLife-Studie war die Einführung der *gesunden Überlebenszeit*, deren Verlängerung beim Menschen - auch unter gesundheitspolitischen Gesichtspunkten - ein wünschenswerter Effekt wäre.

### Wahl der Versuchstiere

Die Experimente der CreaLife-Studie wurden mit weiblichen C57BL/6J-Mäusen durchgeführt, einem weit verbreiteten Inzucht-Stamm. In verschiedenen Studien war jedoch das männliche Geschlecht ein Faktor, welcher verstärkt mit einer Verlängerung der Überlebensdauer durch die Intervention assoziiert war [246, 137].

Zwischen den untersuchten Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Alters, der wichtigsten Einflussgröße für die Ausprägung von Markern für die Alterung.

Der Einfluß der Wahl der Versuchstiere auf die Ergebnisse dieser Untersuchung läßt sich zusammenfassend wie folgt beschreiben: Eine Verfälschung der Ergebnisse durch ein unterschiedliches Altersprofil der Versuchsgruppen wurde ausgeschlossen. Bei Verwendung von männlichen statt weiblichen Versuchstieren wären möglicherweise noch deutlichere Veränderungen altersassoziierter Prozesse und der Überlebenszeit festzustellen gewesen.

Um aus den Ergebnissen allgemeinere Aussagen ableiten zu können, wurde auf ein Tiermodell beschleunigter Alterung verzichtet. Allerdings wären in einem solchen Modell größere Unterschiede nach Intervention wahrscheinlicher gewesen, auch wenn sie nicht den physiologischen Alterungsprozess widerspiegeln [247].

## 6 Zusammenfassung

Die demographische Entwicklung der Industrienationen ist für unsere Gesellschaft eine der großen Herausforderungen der Gegenwart und nahen Zukunft, nicht nur unter einem medizinischen und gesundheitspolitischen Gesichtspunkt. Mit dem wachsenden Anteil älterer Menschen an der Bevölkerung steigt auch die Inzidenz altersassoziierter Erkrankungen rasant an. Das Bewusstsein für die Bedeutung *gesunden Alterns* wächst.

Die Bearbeitung der Frage, warum wir älter werden und letztendlich sterben, kann auf eine lange Tradition zurückblicken, ebenso wie die bis dato erfolglose Suche nach dem "Jungbrunnen". Unzählige Theorien über mögliche Mechanismen und Interaktionen wurden bislang aufgestellt, was auf die äußerst komplexe Natur des Phänomens Altern hinweist. Nach dem heutigen Kenntnisstand plausible Erklärungsmodelle postulieren eine ursächliche Bedeutung des durch freie Radikale vermittelten *oxidativen Stresses*. Im Rahmen des Elektronentransports durch die Enzymkomplexe der Atmungskette entstehen bereits unter physiologischen Bedingungen hochreagible oxidativ-toxische Sauerstoffverbindungen, die zu einer gravierenden Schädigung von Makromolekülen wie beispielsweise der mtDNA führen können. So könnte ein *circulus vitiosus* aus oxidativer Schädigung und gesteigerter Produktion freier Radikale initiiert werden, der im Zelltod mündet. Dieser Pathomechanismus scheint nicht nur beim physiologischen Alterungsprozess wirksam zu sein, sondern auch in der Ätiopathogenese unterschiedlicher neurodegenerativer "Alterserkrankungen". Die Produktion freier Radikale und der Energiestoffwechsel der Zelle stehen in enger Wechselbeziehung, eine Modulation des oxidativen Stresses durch genetische Manipulationen hatte in Tiermodellen einen lebensverlängernden Effekt. Beim Menschen sind diese derzeit nicht praktikabel und diätetische Maßnahmen waren, abgesehen von der kalorischen Restriktion, allenfalls von mäßigem Erfolg gekrönt.

Kreatin ist eine körpereigene Substanz und als leistungssteigerndes Nahrungsergänzungsmittel bei Sportlern weit verbreitet. Das Kreatin/Kreatinphosphat-System spielt in der Energiehomöostase des Organismus eine wichtige stabilisierende Rolle, insbesondere in Muskulatur und Gehirn.

In verschiedenen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen mit einer erhöhten Exposition gegenüber oxidativem Stress führt die orale Supplementation mit Kreatin zu einer signifikanten Neuroprotektion und einer zum Teil verlängerten Überlebensdauer. Verantwortliche Schutz- und Wirkmechanismen sind möglicherweise die zusätzliche Verfügbarkeit von ATP für ATPasen zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials, die Stabilisierung der mitochondrialen *transition pore* als Schutz vor dem Beginn der Apoptose-Kaskade, die Regulation diverser Gene und die günstige Veränderung des ADP/ATP-Quotienten als Grundlage für eine Verminderung der Radikalproduktion in der Atmungskette.

Wie bereits angedeutet, liegen dem physiologischen Alterungsprozess und degenerativen Erkrankungen teilweise gemeinsame Entstehungsmechanismen zu Grunde. Es war anzu-



nehmen, dass nicht nur Tiermodelle neurodegenerativer Erkrankungen, sondern auch gesunde Tiere von einer oralen Langzeiteinnahme von Kreatin im Sinne einer Lebensverlängerung profitieren würden. Diese Hypothese konnte im Rahmen der CreaLife-Studie erstmals bestätigt werden.

Um mehr über die Wirkung von Kreatin auf Alterung und Neurodegeneration zu erfahren, mussten morphologische Korrelate zu Grunde liegender molekularer Mechanismen analysiert werden. Die untersuchten Biomarker für Alterung und oxidativen Stress wurden auch im Hinblick auf die funktionelle Relevanz für die Zelle ausgewählt. Anatomischer Fokus war der *Hippocampus*, der unter anderem bei Lernvorgängen eine wichtige Rolle spielt und gegenüber altersassoziierten und neurodegenerativen Prozessen besonders vulnerabel ist. Untersucht wurde die Akkumulation von *Lipofuszin* - auch als Alterungspigment bekannt - dessen vermehrtes intralysosomales Auftreten mit dem Alter für diverse Spezies beschrieben wurde. Vor allem postmitotische Zellen sind betroffen und es gibt starke Hinweise für eine funktionelle Relevanz im Zellstoffwechsel, zumal Lipofuszin als indirekter Marker für oxidativen Stress bezeichnet werden kann. Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Hippocampus war ein starker Trend ( $p = 0,06$ ) zu einem geringeren Akkumulieren von Lipofuszin in den Pyramidenzellen der CA2-Region in der Verumgruppe. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit der signifikant besseren Gedächtnisleistung von Kreatin behandelten Tieren.

Nach der *mitochondrialen Theorie* des Alterns kumulieren mit dem Alter Schäden in der mtDNA in Form von Deletionen. Das vermehrte Auftreten von Deletionen wurde auch für neurodegenerative Erkrankungen beschrieben. Der Anteil deletierter mtDNA einer Zelle korreliert mit ihrer Funktion und verursacht ab einem gewissen Grad eine funktionelle Beeinträchtigung, die sich beispielsweise in Form der COX-Defizienz nachweisen lässt. Es existieren Tiermodelle beschleunigter Alterung, für die eine funktionell relevante Zunahme von Punktmutationen und Deletionen beschrieben wurde. Allerdings ist deren Gewichtung im physiologischen Alterungsprozess von Wildtypmäusen Gegenstand aktueller Diskussionen. Um eine spezifische Aussage über die Pyramidenzellen des Hippocampus machen zu können, wurde das Verfahren der Lasermikrodissektion gewählt, welches Untersuchungen auf Einzelzellebene ermöglicht. Nach dem Vorbild der Quantifizierung der *common deletion* beim Menschen wurde neben einer lrPCR erstmals eine rtPCR für die Maus etabliert. Auch die diagnostische Standardmethode der sequentiellen COX/SDH-Färbung wurde für das Gehirn der Maus optimiert. Trotz einwandfreier Funktion der angewandten Methoden konnten für den Menschen beschriebene Veränderungen bei der Maus nicht reproduziert werden.

Wenigstens bei der Maus scheinen möglicherweise andere molekulare Interaktionen eine wichtigere Rolle zu spielen. Theorien, welche die zunehmende Dysfunktion des Zellstoffwechsels durch die altersassoziierte Akkumulation von Lipofuszin betonen, werden von dieser Arbeit gestützt. Verantwortlich für die Entstehung von Lipofuszin ist auch hier die Produktion freier Radikale in den existentiellen Reaktionen der mitochondrialen Atmungskette, einem postulierten Angriffspunkt von Kreatin.

Es ist anzunehmen, dass der Prozess der Alterung durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird und es kaum möglich ist, ein einzelnes, für alle Lebewesen geltendes molekula-

res Korrelat zu definieren. In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche lebensverlängernde Wirkmechanismen von Kreatin dargestellt und ein morphologisches Korrelat der gesteigerten Lebensdauer konnte nachgewiesen werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Troen, B. R. The biology of aging. *Mt Sinai J Med* **70**, 3–22 (2003).
- [2] Harman, D. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* **928**, 1–21 (2001).
- [3] Harman, D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 10–21 (2006).
- [4] Hughes, K. A. & Reynolds, R. M. Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol* **50**, 421–445 (2005).
- [5] Gompertz, B. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **115**, 513–585 (1825).
- [6] Rosenberg HM, M. J. e. a., Ventura SJ. Births and deaths: United states, 1995. *Mon Vital Stat Rep* **45**, 31–33 (1996).
- [7] Kaeberlein, M., McVey, M. & Guarente, L. Using yeast to discover the fountain of youth. *Sci Aging Knowledge Environ* **2001**, pe1 (2001).
- [8] Shock, N. *Handbook of the Biology of Aging*, 721 (Van Nostrand Reinhold, 1985).
- [9] Riggs, B. L. & Melton, L. J. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* **314**, 1676–1686 (1986).
- [10] Florini, J. *Handbook of Biochemistry in Aging* (CRC Press, 1981).
- [11] Strehler, B. *Time, cells, and aging* (1977).
- [12] Bjorksten, J. Cross linkage and the aging process. In Rothstein, M. (ed.) *Theoretical aspects of aging*, 43–60 (New York: Academic Press, 1974).
- [13] Schneider EL, R. J. (ed.) *Handbook of the biology of aging*. (Academic Press San Diego, 1977).
- [14] Lakatta, E. G. Changes in cardiovascular function with aging. *Eur Heart J* **11 Suppl C**, 22–29 (1990).
- [15] Lindeman, R. D., Tobin, J. & Shock, N. W. Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J Am Geriatr Soc* **33**, 278–285 (1985).

## 7 Literaturverzeichnis

- [16] Bergsma D, H. D. (ed.). *Genetic effects on aging.*, chap. Endocrine regulation of gene activity in aging animals of different genotypes., 335 (1978).
- [17] Brody JA, B. D. *Handbook of the biology of aging.*, chap. Epidemiological and statistical characteristics of the United States elderly population., 3 (Van Nostrand Reinhold, 1985).
- [18] Semsei, I. On the nature of aging. *Mech Ageing Dev* **117**, 93–108 (2000).
- [19] Medvedev, Z. A. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* **65**, 375–398 (1990).
- [20] Kirkwood, T. B. L. *Time of our lives* (Weidenfeld and Nicolson, London, 1999).
- [21] Medawar, P. *An Unsolved Problem of Biology* (H.K. Lewis and Co., London, 1952).
- [22] Williams, G. C. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* **11**, 398–411 (1957).
- [23] Kirkwood, T. B. L. & Holliday, R. The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **205**, 531–546 (1979).
- [24] Gavrilov, L. A. & Gavrilova, N. S. Evolutionary theories of aging and longevity. *ScientificWorldJournal* **2**, 339–356 (2002).
- [25] Edney, E. B. & Gill, R. W. Evolution of senescence and specific longevity. *Nature* **220**, 281–282 (1968).
- [26] Darwin, C. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.* (J. Murray, London, 1859).
- [27] Weismann, A. Making room for the young: Essays upon heredity and kindred biological problems. *Clarendon Press, Oxford* (1889).
- [28] Hamilton, W. D. The moulding of senescence by natural selection. *J Theor Biol* **12**, 12–45 (1966).
- [29] Rose, M. R. The evolutionary theorie of aging. *Oxford University Press* (1991).
- [30] Stearns, S. C., Ackermann, M., Doebeli, M. & Kaiser, M. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3309–3313 (2000).
- [31] Ackermann, M., Schauerte, A., Stearns, S. & Jenal, U. Experimental evolution of aging in a bacterium. *BMC Evol Biol* **7**, 126 (2007).
- [32] Reznick, D., Buckwalter, G., Groff, J. & Elder, D. The evolution of senescence in natural populations of guppies (*poecilia reticulata*): a comparative approach. *Exp Gerontol* **36**, 791–812 (2001).

## 7 Literaturverzeichnis

- [33] Austad, S. N. Retarded senescence in an insular population of virginia opossums. *Journal of Zoology* 695–708 (1993).
- [34] Rose, M. R. A test of of evolutionary theories of senescence. *Nature* **287**, 141–142 (1980).
- [35] Charlesworth, B. Evolution in age-structured populations. *Cambridge University Press* (1994).
- [36] Gavrilova, N. S. *et al.* Evolution, mutations, and human longevity: European royal and noble families. *Hum Biol* **70**, 799–804 (1998).
- [37] L.A.Gavrilov, N. G. Biodemographic study of familial determinants of human longevity. *Population: An English Selection* **13** (2001).
- [38] n.s. Gavrilova, I. G. When does human longevity start? demarcation of the boundaries for human longevity. *J. Anti-Aging Med.* 115–124 (2001).
- [39] Kirkwood, T. B. L. Evolution of aging. *Nature* 301–304 (1977).
- [40] le Bourg, É. A mini-review of the evolutionary theories of aging. is it the time to accept them? *Demographic Research Volume* **4**, 1–28 (2001).
- [41] Szilard, L. On the nature aof the aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 30–45 (1959).
- [42] Hart, R. W. & Setlow, R. B. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 2169–2173 (1974).
- [43] Francis, A. A., Lee, W. H. & Regan, J. D. The relationship of dna excision repair of ultraviolet-induced lesions to the maximum life span of mammals. *Mech Ageing Dev* **16**, 181–189 (1981).
- [44] Orgel, L. E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**, 517–521 (1963).
- [45] Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Protein modifications with aging. In E L Schneider, J. W. R. (ed.) *Handbook of the biology of aging*, 184 – 197 (San Diego (CA): Academic Press, 1996).
- [46] Kohn, R. R. Aging of animals: possible mechanisms. In Kohn, R. R. (ed.) *Principles of mammalian aging* (Englewood Cliffs (NJ): Prentice-Hall, 1978).
- [47] Chavous, D. A., Jackson, F. R. & O'Connor, C. M. Extension of the drosophila lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14814–14818 (2001).

## 7 Literaturverzeichnis

- [48] Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298–300 (1956).
- [49] Vijg, J. *Aging of the genome* (New York: Oxford University Press, 2007).
- [50] Harman, D. & Harman, H. "i thought, thought, thought for four months in vain and suddenly the idea came-an interview with denham and helen harman. interview by k. kitani and g.o. ivy. *Biogerontology* **4**, 401–412 (2003).
- [51] Harman, D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* **20**, 145–147 (1972).
- [52] Harman, D. Free radical theory of aging - consequences of mitochondrial aging. *Age* **6**, 86–94 (1983).
- [53] Harman, D. Free radical theory of aging: increasing the average life expectancy at birth and the maximum life span. *J. Anti-Aging Med* 199–208 (1998).
- [54] Harman, D. Alzheimer's disease: A hypothesis on pathogenesis. *J. Amer. Aging Assoc* **23**, 147–161 (2000).
- [55] Harman, D. Alzheimer's disease: role of aging in pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 384–395 (2002).
- [56] Sohal, R. S. & Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59–63 (1996).
- [57] Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
- [58] Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A. & Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* **43**, 477–503 (2007).
- [59] Bender, A. *et al.* High levels of mitochondrial dna deletions in substantia nigra neurons in aging and parkinson disease. *Nat Genet* **38**, 515–517 (2006).
- [60] Bender, A. *et al.* Creatine improves health and survival of mice. *Neurobiol Aging* (2007).
- [61] Mandavilli, B. S., Santos, J. H. & Van Houten, B. Mitochondrial dna repair and aging. *Mutat Res* **509**, 127–151 (2002).
- [62] Sun, J., Folk, D., Bradley, T. J. & Tower, J. Induced overexpression of mitochondrial mn-superoxide dismutase extends the life span of adult drosophila melanogaster. *Genetics* **161**, 661–672 (2002).
- [63] Schriener, S. E. *et al.* Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308**, 1909–1911 (2005).

## 7 Literaturverzeichnis

- [64] Corral-Debrinski, M. *et al.* Mitochondrial dna deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* **2**, 324–329 (1992).
- [65] Harding, A. E. Growing old: the most common mitochondrial disease of all? *Nat Genet* **2**, 251–252 (1992).
- [66] de Grey, A. D. N. J. The reductive hotspot hypothesis of mammalian aging: membrane metabolism magnifies mutant mitochondrial mischief. *Eur J Biochem* **269**, 2003–2009 (2002).
- [67] Golden, T. R. & Melov, S. Mitochondrial dna mutations, oxidative stress, and aging. *Mech Ageing Dev* **122**, 1577–1589 (2001).
- [68] Pak, J. W. *et al.* Mitochondrial dna mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. *Aging Cell* **2**, 1–7 (2003).
- [69] Wallace, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* **39**, 359–407 (2005).
- [70] Trifunovic, A. *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial dna polymerase. *Nature* **429**, 417–423 (2004).
- [71] Trifunovic, A. Mitochondrial dna and ageing. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 611–617 (2006).
- [72] Kujoth, G. C. *et al.* Mitochondrial dna mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481–484 (2005).
- [73] Khrapko, K. & Vijg, J. Mitochondrial dna mutations and aging: a case closed? *Nat Genet* **39**, 445–446 (2007).
- [74] Khrapko, K., Kraytsberg, Y., de Grey, A. D. N. J., Vijg, J. & Schon, E. A. Does premature aging of the mtdna mutator mouse prove that mtdna mutations are involved in natural aging? *Aging Cell* **5**, 279–282 (2006).
- [75] Hutter, E. *et al.* Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell* **6**, 245–256 (2007).
- [76] Brunk, U. T. & Terman, A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* **269**, 1996–2002 (2002).
- [77] Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol* **211**, 134–143 (2007).

## 7 Literaturverzeichnis

- [78] Gray, D. A. & Woulfe, J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci Aging Knowledge Environ* **2005**, re1 (2005).
- [79] Terman, A. & Brunk, U. T. Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal* **8**, 197–204 (2006).
- [80] Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem Biol Interact* **163**, 29–37 (2006).
- [81] Terman, A. Catabolic insufficiency and aging. *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 27–36 (2006).
- [82] Kanungo, M. S. A model for ageing. *J Theor Biol* **53**, 253–261 (1975).
- [83] Lee, C. K., Weindruch, R. & Prolla, T. A. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* **25**, 294–297 (2000).
- [84] Pletcher, S. D. *et al.* Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted drosophila melanogaster. *Curr Biol* **12**, 712–723 (2002).
- [85] Weindruch, R., Kayo, T., Lee, C. K. & Prolla, T. A. Gene expression profiling of aging using dna microarrays. *Mech Ageing Dev* **123**, 177–193 (2002).
- [86] Zou, S., Meadows, S., Sharp, L., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13726–13731 (2000).
- [87] Kirkwood, T. B. L. New science for an old problem. *Trends Genet* **18**, 441–442 (2002).
- [88] Mobbs, C. V. Neuroendocrinology of aging. In E. L. Schneider, J. W. R. (ed.) *Handbook of the Biology of Aging*, 234 – 282 (San Diego (CA): Academic Press, 1996).
- [89] Denckla, W. D. A time to die. *Life Sci* **16**, 31–44 (1975).
- [90] Gilad, G. M. & Gilad, V. H. Age-related reductions in brain cholinergic and dopaminergic indices in two rat strains differing in longevity. *Brain Res* **408**, 247–250 (1987).
- [91] Cotzias, G. C., Miller, S. T., Tang, L. C. & Papavasiliou, P. S. Levodopa, fertility, and longevity. *Science* **196**, 549–551 (1977).
- [92] Kitani, K. *et al.* Chronic treatment of (-)deprenyl prolongs the life span of male fischer 344 rats. further evidence. *Life Sci* **52**, 281–288 (1993).
- [93] Milgram, N. W., Racine, R. J., Nellis, P., Mendonca, A. & Ivy, G. O. Maintenance on l-deprenyl prolongs life in aged male rats. *Life Sci* **47**, 415–420 (1990).



## 7 Literaturverzeichnis

- [94] Walford, R. L. Immunologic theory of aging: current status. *Fed Proc* **33**, 2020–2027 (1974).
- [95] Miller, R. A. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* **273**, 70–74 (1996).
- [96] Yunis, E. J. & Salazar, M. Genetics of life span in mice. *Genetica* **91**, 211–223 (1993).
- [97] Caruso, C. *et al.* Immunogenetics of longevity. is major histocompatibility complex polymorphism relevant to the control of human longevity? a review of literature data. *Mech Ageing Dev* **122**, 445–462 (2001).
- [98] Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **37**, 614–636 (1965).
- [99] Campisi, J. Cellular senescence and cell death. In Timiras, P. S. (ed.) *In Physiological Basis of Aging and Geriatrics*, 47 – 60 (CRC Press, Boca Raton FL, 2002).
- [100] Weinert, B. T. & Timiras, P. S. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* **95**, 1706–1716 (2003).
- [101] Blackburn, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature* **408**, 53–56 (2000).
- [102] Harley, C. B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* **256**, 271–282 (1991).
- [103] Bodnar, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349–352 (1998).
- [104] Blasco, M. A. *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase rna. *Cell* **91**, 25–34 (1997).
- [105] Lee, H. W. *et al.* Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**, 569–574 (1998).
- [106] Rudolph, K. L. *et al.* Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96**, 701–712 (1999).
- [107] Sugihara, S., Mihara, K., Marunouchi, T., Inoue, H. & Namba, M. Telomere elongation observed in immortalized human fibroblasts by treatment with 60co gamma rays or 4-nitroquinoline 1-oxide. *Hum Genet* **97**, 1–6 (1996).
- [108] Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* **14**, 4240–4248 (1995).

## 7 Literaturverzeichnis

- [109] Chin, L. *et al.* p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97**, 527–538 (1999).
- [110] Tyner, S. D. *et al.* p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45–53 (2002).
- [111] Lockshin, R. & Zakeri, Z. Programmed cell death and apoptosis. In L. D. Tomei, F. O. C. (ed.) *Apoptosis: the molecular basis of death*, 47 – 60 (Cold Spring Harbor Press, Plainview (NY), 1991).
- [112] Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456–1462 (1995).
- [113] Warner, H. R., Hodes, R. J. & Pocinki, K. What does cell death have to do with aging? *J Am Geriatr Soc* **45**, 1140–1146 (1997).
- [114] Vogt, C. *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricians)* (Jent und Gassman, Solothurn, 1842).
- [115] Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–257 (1972).
- [116] Leist, M. & Jaattela, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 589–598 (2001).
- [117] Stennicke, H. R. *et al.* Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* **273**, 27084–27090 (1998).
- [118] Chiarugi, A. & Moskowitz, M. A. Cell biology. parp-1—a perpetrator of apoptotic cell death? *Science* **297**, 200–201 (2002).
- [119] Yu, S.-W. *et al.* Mediation of poly(adp-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**, 259–263 (2002).
- [120] Wachter, K. W. & Finch, C. E. *Between zeus and the salmon. the biodemography of longevity* (Washington.National Academy, 1997).
- [121] Cutler, R. G. Evolutionary perspective of human longevity. In Hazzard, W. R., Andres, R., Bierman, E. L. & Blass, J. P. (eds.) *Principles of geriatric medicine and gerontology*, 15 – 21 (McCraw-Hill, New York, 1990).
- [122] Weindruch, R. & Walford, R. L. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* **215**, 1415–1418 (1982).

## 7 Literaturverzeichnis

- [123] Yu, B. P., Masoro, E. J. & McMahan, C. A. Nutritional influences on aging of fischer 344 rats: I. physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol* **40**, 657–670 (1985).
- [124] Longo, V. D. & Finch, C. E. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* **299**, 1342–1346 (2003).
- [125] Merry, B. J. Dietary restriction in aging. In Sternberg, H. & Timiras, P. S. (eds.) *Studies of aging* (New York: Springer, 1999).
- [126] Masoro, E. J. Dietary restriction and aging. *J Am Geriatr Soc* **41**, 994–999 (1993).
- [127] Mobbs, C. V. *et al.* Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56 Spec No 1**, 34–44 (2001).
- [128] Lee, C. K., Klopp, R. G., Weindruch, R. & Prolla, T. A. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**, 1390–1393 (1999).
- [129] Willcox, B. J. *et al.* Caloric restriction, the traditional okinawan diet, and healthy aging: The diet of the world’s longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. *Ann N Y Acad Sci* **1114**, 434–455 (2007).
- [130] Holloszy, J. O. & Fontana, L. Caloric restriction in humans. *Exp Gerontol* **42**, 709–712 (2007).
- [131] Ingram, D. K., Young, J. & Mattison, J. A. Calorie restriction in nonhuman primates: assessing effects on brain and behavioral aging. *Neuroscience* **145**, 1359–1364 (2007).
- [132] Mattison, J. A., Roth, G. S., Lane, M. A. & Ingram, D. K. Dietary restriction in aging nonhuman primates. *Interdiscip Top Gerontol* **35**, 137–158 (2007).
- [133] Lipman, R. D. *et al.* Disease incidence and longevity are unaltered by dietary antioxidant supplementation initiated during middle age in c57bl/6 mice. *Mech Ageing Dev* **103**, 269–284 (1998).
- [134] Lee, C.-K. *et al.* The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Radic Biol Med* **36**, 1043–1057 (2004).
- [135] Selman, C. *et al.* Life-long vitamin c supplementation in combination with cold exposure does not affect oxidative damage or lifespan in mice, but decreases expression of antioxidant protection genes. *Mech Ageing Dev* **127**, 897–904 (2006).
- [136] Bezlepkin, V. G., Sirota, N. P. & Gaziev, A. I. The prolongation of survival in mice by dietary antioxidants depends on their age by the start of feeding this diet. *Mech Ageing Dev* **92**, 227–234 (1996).

## 7 Literaturverzeichnis

- [137] Navarro, A. *et al.* Vitamin e at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1392–9 (2005).
- [138] Morley, A. A. & Trainor, K. J. Lack of an effect of vitamin e on lifespan of mice. *Biogerontology* **2**, 109–112 (2001).
- [139] Finch, C. E. & Tanzi, R. E. Genetics of aging. *Science* **278**, 407–411 (1997).
- [140] Jazwinski, S. M. Aging and longevity genes. *Acta Biochim Pol* **47**, 269–279 (2000).
- [141] Jazwinski, S. M. Longevity, genes, and aging. *Science* **273**, 54–59 (1996).
- [142] Friedman, D. B. & Johnson, T. E. A mutation in the age-1 gene in caenorhabditis elegans lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* **118**, 75–86 (1988).
- [143] Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. & Tabtiang, R. A c. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461–464 (1993).
- [144] Feng, J., Bussiere, F. & Hekimi, S. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in caenorhabditis elegans. *Dev Cell* **1**, 633–644 (2001).
- [145] Lakowski, B. & Hekimi, S. Determination of life-span in caenorhabditis elegans by four clock genes. *Science* **272**, 1010–1013 (1996).
- [146] Hekimi, S. How genetic analysis tests theories of animal aging. *Nat Genet* **38**, 985–991 (2006).
- [147] Bartke, A. Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* **146**, 3718–3723 (2005).
- [148] Chiu, C.-H., Lin, W.-D., Huang, S.-Y. & Lee, Y.-H. Effect of a c/ebp gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev* **18**, 1970–1975 (2004).
- [149] Holzenberger, M. *et al.* Igf-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421**, 182–187 (2003).
- [150] Kurosu, H. *et al.* Suppression of aging in mice by the hormone klotho. *Science* **309**, 1829–1833 (2005).
- [151] Liu, X. *et al.* Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev* **19**, 2424–2434 (2005).
- [152] Finch, C. E. Longevity, senescence, and the genome. *Univ. of Chicago Press* (1990).

## 7 Literaturverzeichnis

- [153] Martin, G. M., Austad, S. N. & Johnson, T. E. Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet* **13**, 25–34 (1996).
- [154] Trepel, M. *Neuroanatomie* (Urban und Fischer, 1999).
- [155] Driscoll, I. *et al.* The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cereb Cortex* **13**, 1344–1351 (2003).
- [156] Issa, A. M., Rowe, W., Gauthier, S. & Meaney, M. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* **10**, 3247–3254 (1990).
- [157] Geinisman, Y., Detoledo-Morrell, L., Morrell, F. & Heller, R. E. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* **45**, 223–252 (1995).
- [158] Alberts, B. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* (WILEY-VCH, 1999).
- [159] Reynolds, T. From small things. *BMJ* **335**, 747–748 (2007).
- [160] Krishnan, K. J., Greaves, L. C., Reeve, A. K. & Turnbull, D. M. Mitochondrial dna mutations and aging. *Ann N Y Acad Sci* **1100**, 227–240 (2007).
- [161] Schwartz, M. & Vissing, J. Paternal inheritance of mitochondrial dna. *N Engl J Med* **347**, 576–580 (2002).
- [162] Herrero, A. & Barja, G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex i of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 609–615 (2000).
- [163] Richter, C. Oxidative damage to mitochondrial dna and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 647–653 (1995).
- [164] Vermulst, M. *et al.* Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nat Genet* **39**, 540–543 (2007).
- [165] Le Bras, M., Clement, M.-V., Pervaiz, S. & Brenner, C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* **20**, 205–219 (2005).
- [166] Gutteridge, J. & Halliwell, B. *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease* (Oxford University Press, 1994).
- [167] Harper, M.-E., Bevilacqua, L., Hagopian, K., Weindruch, R. & Ramsey, J. J. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiol Scand* **182**, 321–331 (2004).
- [168] Porta, E. A. Pigments in aging: an overview. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 57–65 (2002).

## 7 Literaturverzeichnis

- [169] Terman, A. & Brunk, U. T. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1400–1404 (2004).
- [170] Jolly, R. D., Palmer, D. N. & Dalefield, R. R. The analytical approach to the nature of lipofuscin (age pigment). *Arch Gerontol Geriatr* **34**, 205–217 (2002).
- [171] Jung, T., Bader, N. & Grune, T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann N Y Acad Sci* **1119**, 97–111 (2007).
- [172] Terman, A. & Brunk, U. T. Ceroid/lipofuscin formation in cultured human fibroblasts: the role of oxidative stress and lysosomal proteolysis. *Mech Ageing Dev* **104**, 277–291 (1998).
- [173] Brunk, U. T. & Terman, A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* **33**, 611–619 (2002).
- [174] Godley, B. F. *et al.* Blue light induces mitochondrial dna damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 21061–21066 (2005).
- [175] Walker, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **50**, 177–242 (1979).
- [176] Bembien, M. G. & Lamont, H. S. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Med* **35**, 107–125 (2005).
- [177] Persky, A. M. & Brazeau, G. A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev* **53**, 161–176 (2001).
- [178] Löffler, G. & Petrides, P. *Biochemie und Pathobiochemie* (Springer-Verlag, 1998).
- [179] Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. & Eppenberger, H. M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **281** ( Pt 1), 21–40 (1992).
- [180] Balestrino, M., Rebaudo, R. & Lunardi, G. Exogenous creatine delays anoxic depolarization and protects from hypoxic damage: dose-effect relationship. *Brain Res* **816**, 124–130 (1999).
- [181] Parodi, M. *et al.* Effects of exogenous creatine on population spike amplitude and on postanoxic hyperexcitability in brain slices. *Brain Res* **963**, 197–202 (2003).
- [182] Boveris, A. & Cadenas, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* **54**, 311–314 (1975).
- [183] Turrens, J. F., Alexandre, A. & Lehninger, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex iii of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **237**, 408–414 (1985).

## 7 Literaturverzeichnis

- [184] Esposito, L. A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B. A. & Wallace, D. C. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4820–4825 (1999).
- [185] Graham, B. H. *et al.* A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* **16**, 226–234 (1997).
- [186] Dykens, J. A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $ca^{2+}$  and  $na^{+}$ : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* **63**, 584–591 (1994).
- [187] Novelli, A., Reilly, J. A., Lysko, P. G. & Henneberry, R. C. Glutamate becomes neurotoxic via the n-methyl-d-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* **451**, 205–212 (1988).
- [188] Zeevalk, G. D. & Nicklas, W. J. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 1285–1292 (1990).
- [189] Xu, C. J. *et al.* Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. a comparison with atp-dependent glutamate uptake. *J Biol Chem* **271**, 13435–13440 (1996).
- [190] Beutner, G., Ruck, A., Riede, B. & Brdiczka, D. Complexes between hexokinase, mitochondrial porin and adenylate translocator in brain: regulation of hexokinase, oxidative phosphorylation and permeability transition pore. *Biochem Soc Trans* **25**, 151–157 (1997).
- [191] Gustafsson, A. & Gottlieb, R. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* (2007).
- [192] Dolder, M., Wendt, S. & Wallimann, T. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept* **10**, 93–111 (2001).
- [193] O’Gorman, E. *et al.* The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* **414**, 253–257 (1997).
- [194] Lenz, H. *et al.* Inhibition of cytosolic and mitochondrial creatine kinase by sirna in hacat- and hela3-cells affects cell viability and mitochondrial morphology. *Mol Cell Biochem* **306**, 153–162 (2007).
- [195] Mihic, S., MacDonald, J. R., McKenzie, S. & Tarnopolsky, M. A. Acute creatine loading increases fat-free mass, but does not affect blood pressure, plasma creatinine, or ck activity in men and women. *Med Sci Sports Exerc* **32**, 291–296 (2000).

## 7 Literaturverzeichnis

- [196] Volek, J. S. *et al.* Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. *Med Sci Sports Exerc* **31**, 1147–1156 (1999).
- [197] Sipila, I., Rapola, J., Simell, O. & Vannas, A. Supplementary creatine as a treatment for gyrate atrophy of the choroid and retina. *N Engl J Med* **304**, 867–870 (1981).
- [198] Zhu, S. *et al.* Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* **24**, 5909–5912 (2004).
- [199] Prass, K. *et al.* Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 452–459 (2007).
- [200] Safdar, A., Yardley, N., Snow, R., Melov, S. & Tarnopolsky, M. Global and targeted gene expression and protein content in skeletal muscle of young men following short-term creatine monohydrate supplementation. *Physiol Genomics* (2007).
- [201] Jacobs, I. Dietary creatine monohydrate supplementation. *Can J Appl Physiol* **24**, 503–514 (1999).
- [202] Cribb, P. J., Williams, A. D. & Hayes, A. A creatine-protein-carbohydrate supplement enhances responses to resistance training. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 1960–1968 (2007).
- [203] Holtzman, D. *et al.* In vivo brain phosphocreatine and atp regulation in mice fed a creatine analog. *Am J Physiol* **272**, C1567–77 (1997).
- [204] Bender, A. *et al.* Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in huntington’s disease. *J Neurol* **252**, 36–41 (2005).
- [205] Matthews, R. T. *et al.* Creatine and cyclocreatine attenuate mptp neurotoxicity. *Exp Neurol* **157**, 142–149 (1999).
- [206] Lawler, J. M., Barnes, W. S., Wu, G., Song, W. & Demaree, S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 47–52 (2002).
- [207] Bender, A. *et al.* Creatine supplementation in parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. *Neurology* **67**, 1262–1264 (2006).
- [208] Bloom, M. Z. Nih announces phase 3 clinical trial of creatine for parkinson’s disease. *Consult Pharm* **22**, 378 (2007).
- [209] Ellis, A. C. & Rosenfeld, J. The role of creatine in the management of amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *CNS Drugs* **18**, 967–980 (2004).
- [210] Klivenyi, P. *et al.* Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* **5**, 347–350 (1999).



## 7 Literaturverzeichnis

- [211] Groeneveld, G. J. *et al.* A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **53**, 437–445 (2003).
- [212] Shefner, J. M. *et al.* A clinical trial of creatine in als. *Neurology* **63**, 1656–1661 (2004).
- [213] Matthews, R. T. *et al.* Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of huntington’s disease. *J Neurosci* **18**, 156–163 (1998).
- [214] Ferrante, R. J. *et al.* Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of huntington’s disease. *J Neurosci* **20**, 4389–4397 (2000).
- [215] Verbessem, P. *et al.* Creatine supplementation in huntington’s disease: a placebo-controlled pilot trial. *Neurology* **61**, 925–930 (2003).
- [216] Kley, R. A., Vorgerd, M. & Tarnopolsky, M. A. Creatine for treating muscle disorders. *Cochrane Database Syst Rev* CD004760 (2007).
- [217] Walter, M. C. *et al.* Creatine monohydrate in muscular dystrophies: A double-blind, placebo-controlled clinical study. *Neurology* **54**, 1848–1850 (2000).
- [218] Klopstock, T. *et al.* A placebo-controlled crossover trial of creatine in mitochondrial diseases. *Neurology* **55**, 1748–1751 (2000).
- [219] Vorgerd, M. *et al.* Effect of high-dose creatine therapy on symptoms of exercise intolerance in mcardle disease: double-blind, placebo-controlled crossover study. *Arch Neurol* **59**, 97–101 (2002).
- [220] Schulze, A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* **244**, 143–150 (2003).
- [221] Mercimek-Mahmutoglu, S. *et al.* Gamt deficiency: features, treatment, and outcome in an inborn error of creatine synthesis. *Neurology* **67**, 480–484 (2006).
- [222] Andres, R. H. *et al.* Effects of creatine treatment on the survival of dopaminergic neurons in cultured fetal ventral mesencephalic tissue. *Neuroscience* **133**, 701–713 (2005).
- [223] Andres, R. H. *et al.* Effects of creatine treatment on survival and differentiation of gaba-ergic neurons in cultured striatal tissue. *J Neurochem* **95**, 33–45 (2005).
- [224] McMorris, T., Mielcarz, G., Harris, R. C., Swain, J. P. & Howard, A. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn* **14**, 517–528 (2007).
- [225] Thorsteinsdottir, B., Grande, J. P. & Garovic, V. D. Acute renal failure in a young weight lifter taking multiple food supplements, including creatine monohydrate. *J Ren Nutr* **16**, 341–345 (2006).

## 7 Literaturverzeichnis

- [226] Shao, A. & Hathcock, J. N. Risk assessment for creatine monohydrate. *Regul Toxicol Pharmacol* **45**, 242–251 (2006).
- [227] Pline, K. A. & Smith, C. L. The effect of creatine intake on renal function. *Ann Pharmacother* **39**, 1093–1096 (2005).
- [228] Bender, A., Samtleben, W., Elstner, M. & Klopstock, T. Long-term creatine supplementation is safe in aged patients with parkinson disease. *Nutrition Research* **28**, 172–178 (2008).
- [229] Jiang, C. H., Tsien, J. Z., Schultz, P. G. & Hu, Y. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1930–1934 (2001).
- [230] Nicklas, W. *et al.* Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* **36**, 20–42 (2002).
- [231] Paxinos, G. & Franklin, K. *The Mouse Brain* (Elsevier, San Diego, 2004), 2 edn.
- [232] Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol* **129**, 389–406 (2008).
- [233] E, P. A. G. *Histochemistry: Theoretical and Applied*, vol. 2 (Churchill-Livingstone, London, 1972), 3 edn.
- [234] Knoche, H. *Leitfaden der histologischen Technik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1979).
- [235] Romeis, B. *Mikroskopische Technik* (Urban und Schwarzenberg Verlag, München, 1989), 17 edn.
- [236] Lyon, H. *Theory and Strategy in Histochemistry* (Springer-Verlag, Berlin, 1991).
- [237] Bancroft, J. D. & Gamble, M. *Theory and Practice of Histological Techniques* (Churchill Livingstone, 2001), 5 edn.
- [238] Sheehy, M. R. J. A flow-cytometric method for quantification of neurolipofuscin and comparison with existing histological and biochemical approaches. *Arch Gerontol Geriatr* **34**, 233–248 (2002).
- [239] Benavides, S. H., Monserrat, A. J., Farina, S. & Porta, E. A. Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. *Arch Gerontol Geriatr* **34**, 219–231 (2002).
- [240] Vermulst, M. *et al.* Dna deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet* **40**, 392–394 (2008).

## 7 Literaturverzeichnis

- [241] Fukui, H., Diaz, F., Garcia, S. & Moraes, C. T. Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14163–14168 (2007).
- [242] Diaz, F., Thomas, C. K., Garcia, S., Hernandez, D. & Moraes, C. T. Mice lacking *cox10* in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* **14**, 2737–2748 (2005).
- [243] Ohsako, S., Nagano, R., Sugimoto, Y. & Goto, K. Comparison of the nuclear dna stability against freezing-thawing and high temperature treatments between spermatozoa and somatic cells. *J Vet Med Sci* **59**, 1085–1088 (1997).
- [244] Fraser, L. & Strzezek, J. Effects of freezing-thawing on dna integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod Domest Anim* **40**, 530–536 (2005).
- [245] Melov, S., Hinerfeld, D., Esposito, L. & Wallace, D. C. Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial dna rearrangements with age. *Nucleic Acids Res* **25**, 974–982 (1997).
- [246] Burger, J. M. S. & Promislow, D. E. L. Sex-specific effects of interventions that extend fly life span. *Sci Aging Knowledge Environ* **2004**, pe30 (2004).
- [247] Nadon, N. L. Of mice and monkeys: National institute on aging resources supporting the use of animal models in biogerontology research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**, 813–815 (2006).

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AGAT</b>	Glycin-Amidino-transferase
<b>ALS</b>	Amyotrophe Lateralsklerose
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>AOI</b>	area of interest
<b>AP</b>	Antagonistic Pleiotropy
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Bdnf</b>	Brain Derived Neurotrophic Factor
<b>CA</b>	Cornu ammonis
<b>CH</b>	Chorea Huntington
<b>COX</b>	Cytochrom C-Oxidase
<b>CP</b>	crossing points
<b>CPEO</b>	Chronisch Progressive Externe Ophthalmoplegie
<b>CT</b>	Crossing Time
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>FADH</b>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<b>FELASA</b>	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
<b>FRET</b>	Fluorescence resonance energy transfer
<b>FRTA</b>	Free Radical Theory of Aging
<b>GABA</b>	Gamma-Amino-Buttersäure
<b>GAMT</b>	Guanidinoacetat-Methyltransferase
<b>GSF</b>	National Research Center for Environment and Health
<b>Hgf</b>	Hepatocyte growth factor
<b>KR</b>	Kalorische Restriktion
<b>lrPCR</b>	Long Range Polymerase Chain Reaction
<b>MA</b>	Mutationen Akkumulation
<b>MPP+</b>	1-Methyl-4-Phenylpyridin
<b>MPTP</b>	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydro-pyridin
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomografie
<b>mt</b>	mitochondrial
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>NADH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
<b>NBT</b>	Nitro Blau Tetrazolium
<b>nDNA</b>	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
<b>Ndn</b>	Needin

<b>O·</b>	Superoxid-Radikal
<b>OT</b>	Objektträger
<b>PMS</b>	Phenazine Methosulphat
<b>PZT</b>	Programmierter Zelltod
<b>rDNA</b>	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Spezies
<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>rtPCR</b>	Real Time Polymerase Chain Reaction
<b>SDH</b>	Succinat-Dehydrogenase
<b>SHIRPA</b>	Smithkline Beecham, MRC Harwell, Imperial College, the Royal London hospital phenotype assessment
<b>SOD</b>	Superoxid-Dismutase
<b>TAMRA</b>	Carboxytetramethylrhodamine
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>Tgfb 2</b>	transforming growth factor, beta 2
<b>tRNA</b>	transfer-Ribonukleinsäure
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b>8-OHdG</b>	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klopstock für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Forschungsgruppe und vor allem für die freundschaftliche Unterstützung und Förderung auch über die wissenschaftliche Tätigkeit hinaus. Er weckte meine Faszination für das menschliche Gehirn und das spannende Gebiet der molekularen Neurobiologie. Desweiteren bedanke ich mich für die Vertretung der vorliegenden Arbeit gegenüber der medizinischen Fakultät sowie der Universität.

Herrn Dr. Bender danke ich herzlich für die konstruktive Betreuung. Mit seiner humorvollen Art war er zu jeder Zeit ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner. Auch in der Auswahl des Themas und der praktischen Umsetzung war er mit seinem Ideenreichtum ein wertvoller Diskussionspartner.

Für die freundliche Betreuung an der GSF bedanke ich mich bei Frau Dr. Vogt-Weisenhorn. Mit Ihrer strukturierten Anleitung ermöglichte sie mir ein äußerst effizientes Arbeiten.

Bei Frau Anneser bedanke ich mich für die erfahrene Unterstützung bei der praktischen Umsetzung histologischer Fragestellungen.

Ich danke Herrn FRCP Prof. Dr. Brandt dafür, dass ich diese Arbeit in der von Ihm geleiteten Klinik und Poliklinik für Neurologie der Ludwig–Maximilians–Universität München durchführen durfte. Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. Wurst für die Möglichkeit der Bearbeitung von Teilbereichen dieser Arbeit an der GSF in Neuherberg zu Dank verpflichtet.

## 10 Lebenslauf

**Name, Vorname:** Haack, Tobias  
**Adresse:** Einsteinstr. 155, 81675 München  
**Geburtsort:** Überlingen  
**Geburtsdatum:** 05.03.1982  
**Staatsangehörigkeit:** Deutsch  
**Familienstand:** ledig

### Schulbildung:

1988 - 1992	Grund- und Hauptschule Owingen
1992 - 2000	Droste-Hülshoff-Gymnasium Meersburg, Teilnahme am Modellversuch des achtjährigen gymnasialen Bildungsweges, Abitur mit der Note 1,9
07/98 - 11/98	Viermonatiger Aufenthalt am Birkenhead College in Neuseeland, IELTS-Sprachtest mit der Note 6,5

### Akademische Bildung:

2000 - 2007	Nach Auswahlgespräch Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2003 - 2004	Zweitstudium an der Hochschule für Philosophie, Philosophische Fakultät S.J. in München
<b>Promotion</b>	Seit 2005 Arbeitsgruppe für Molekulare Neurogenetik, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Klinikum Großhadern

### Beruf:

Seit 01/2008	Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Neurologie, Klinikum Großhadern, neurologische Intensivstation
--------------	--

München, im Juni 2008