

Taurinmangel und Mitochondrienfunktion

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jessica Lüsebrink

aus Werdohl

Düsseldorf 2007

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Ulrich Warskulat

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2008

Zu wissen, dass wir wissen was wir wissen und zu wissen, dass wir nicht wissen was wir nicht wissen, das ist wahres Wissen.

Nikolaus Kopernikus

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| 1 EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 Taurin..... | 9 |
| 1.2 Taurintransporter-Knockout-Maus (<i>taut -/-</i>)..... | 10 |
| 1.3 Mitochondrien | 11 |
| 1.4 Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit | 14 |
| 1.5 Zielsetzung | 16 |
| | |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 2.1 Enzyme und Chemikalien | 17 |
| 2.2 Oligonukleotide | 18 |
| 2.3 Antikörper | 19 |
| 2.3.1 Primärantikörper..... | 19 |
| 2.3.2 Sekundärantikörper | 19 |
| 2.4 Versuchstiere..... | 20 |
| 2.4.1 Genotypisierung | 20 |
| 2.5 Nachweis von mitochondrialen DNA-Deletionen mittels quantitativer Real-time-PCR | 21 |
| 2.6 DNA-Microarray-Hybridisierung | 21 |
| 2.6.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese..... | 21 |
| 2.6.2 Array-Analyse..... | 22 |
| 2.7 Genexpressionsanalyse über Real-time-PCR | 22 |
| 2.8 Mitochondrienisolation | 23 |
| 2.9 Proteinanalyse | 24 |
| 2.9.1 Präparation von Proteinen aus Mitochondrien | 24 |
| 2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD | 24 |
| 2.9.3 Präparation von Proteinen für die SDS-PAGE | 24 |
| 2.9.4 SDS-PAGE..... | 24 |
| 2.9.5 Färbung von Gelen nach SDS-PAGE | 25 |
| 2.9.6 Western Blot-Analyse..... | 25 |
| 2.9.7 Immundetektion..... | 26 |
| 2.10 Immunpräzipitation..... | 26 |
| 2.11 Aktivitätstests..... | 27 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.11.1 | JC-1-Assay..... | 27 |
| 2.11.2 | Cytochrom c Oxidase-Aktivität und Bestimmung der mitochondrialen Membranintegrität | 27 |
| 2.11.3 | Citratsynthase-Assay | 28 |
| 2.12 | DAF-FM Fluoreszenz-Messung | 28 |
| 2.13 | <i>Lightscattering</i> | 28 |
| 2.14 | statistische Auswertung | 29 |
| 3 | ERGEBNISSE | 31 |
| 3.1 | Nachweis von mtDNA-Deletionen in Skelettmuskel, Leber und Herz von Wildtyp- und <i>taut</i> ^{-/-} Mäusen | 31 |
| 3.1.1 | Etablierung einer Methode zum Nachweis von mtDNA-Deletionen mittels Real-time-PCR | 31 |
| 3.1.2 | Altersabhängiges Auftreten von mtDNA-Deletionen..... | 34 |
| 3.1.3 | mtDNA-Deletionen und Taurinmangel..... | 34 |
| 3.2 | Analyse von Risikofaktoren im Herzen von Wildtyp- und <i>taut</i> ^{-/-} Mäusen mittels DNA-Mikroarrays, Real-time-PCR und Western Blot | 38 |
| 3.3 | Untersuchungen an isolierten Mitochondrien aus Leber und Skelettmuskel von Wildtyp und <i>taut</i> ^{-/-} Mäusen | 42 |
| 3.3.1 | Aktivitätsassays..... | 42 |
| 3.3.1.1 | JC-1-Assay..... | 42 |
| 3.3.1.2 | Citratsynthase-Assay | 44 |
| 3.3.1.3 | Cytochrom c Oxidase-Assay | 44 |
| 3.3.2 | Western Blot-Analysen von mitochondrialen Proteinen..... | 46 |
| 3.3.2.1 | Nachweis von Atmungskettenkomplexen..... | 46 |
| 3.3.2.2 | Nachweis nitrierter Proteine | 48 |
| 3.3.3 | Identifizierung nitrierter Proteine..... | 49 |
| 3.3.4 | Nachweis von NO und Peroxynitrit..... | 49 |
| 3.3.4.1 | Farbstoffkontrolle | 52 |
| 3.3.4.2 | Nachweis von NO-Synthasen | 54 |
| 3.3.4.3 | Atmungskettenabhängige NO-Produktion..... | 56 |
| 3.3.4.4 | pH-Abhängigkeit der DAF-FM Fluoreszenz | 56 |
| 3.3.4.5 | Einfluss der Osmolarität auf DAF-FM Fluoreszenz | 58 |
| 3.3.4.6 | NO-Freisetzung aus Speicherproteinen | 60 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4 | DISKUSSION..... | 63 |
| 4.1 | Taurinmangel und Integrität des mtGenoms..... | 63 |
| 4.2 | Kardiale Genexpression in <i>taut</i> ^{-/-} Mäusen..... | 65 |
| 4.3 | Taurinmangel und Bildung von RNS im Mitochondrium von Mäusen | 67 |
| 4.4 | Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette in <i>taut</i> ^{-/-} Mäusen | 70 |
| 4.5 | Ausblick und klinische Relevanz | 72 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 75 |
| 6 | SUMMARY | 77 |
| 7 | LITERATUR..... | 79 |
| 8 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 93 |
| 9 | DANKSAGUNG | 95 |
| 10 | ERKLÄRUNG | 97 |

1 Einleitung

1.1 Taurin

Taurin, oder 2-Aminoethansulfonsäure, ist die im Tierreich am häufigsten vorkommende freie Aminosäure (HUXTABLE, 1992). Es ist ubiquitär im Tierreich, während es im Pflanzenreich mit wenigen Ausnahmen nicht vorkommt. Je nach Gewebe liegen die intrazellularen Konzentrationen bei 5 bis 50 mmol/kg, wobei vor allem in Skelettmuskel, Herz, Gehirn und Leber sehr hohe Konzentrationen zu finden sind (HUXTABLE, 1992).

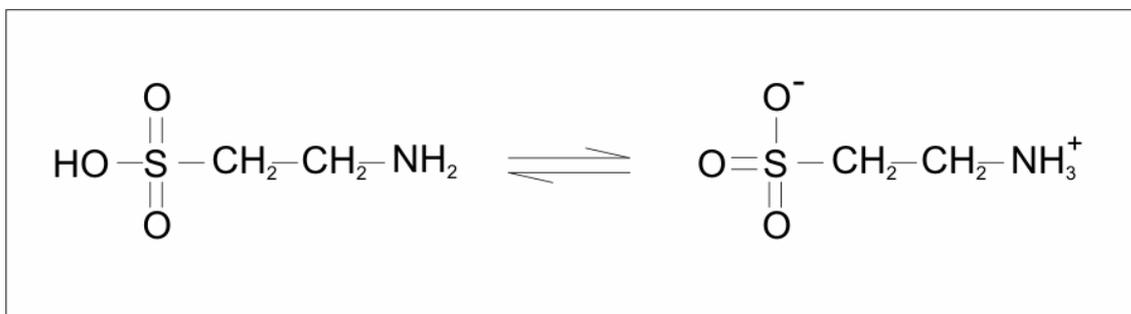


Abb. 1.1: Taurin (2-Aminoethansulfonsäure, C₂H₇O₃NS). Im physiologischen pH-Bereich liegt das Molekül fast vollständig als Zwitterion vor.

Taurin wird über mehrere Oxidationsschritte aus den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein gebildet (HUXTABLE, 1986). Die Möglichkeit der Taurinbildung variiert dabei sehr stark zwischen den verschiedenen Spezies. So können z.B. Katzen Taurin nicht selbst bilden und sind auf die Aufnahme mit der Nahrung angewiesen (HAYES *et al.*, 1989).

Taurin besitzt zwei funktionelle Gruppen: die saure Sulfon- und die basische Aminogruppe (Abb. 1.1). Im physiologischen pH-Bereich um pH 7,4 liegt es fast vollständig als Zwitterion vor und kann deswegen durch biologische Membranen nicht hindurch diffundieren. Der Transport in die Zelle erfolgt durch den Na⁺-abhängigen Taurintransporter (TAUT). Der Transporter wird in nahezu jedem Gewebe exprimiert und ermöglicht es, dass hohe Konzentrationsgradienten gebildet werden können (SMITH *et al.*, 1992; VINNAKOTA *et al.*, 1997; SATSU *et al.*, 2003).

Im Organismus spielt Taurin bei zahlreichen Prozessen eine wichtige Rolle, z.B. als Osmolyt, bei der Membranstabilisierung und der antioxidativen Abwehr (HUXTABLE, 1992; DELLA CORTE, 2000).

Taurin ist bis auf wenige Ausnahmen metabolisch inert. Seine zwitterionischen Eigenschaften und das Vorkommen eines selektiven Transportersystems prädestinieren es deshalb als wichtiges Osmolyt (HUXTABLE, 1992).

Neben der Osmoregulation schützt Taurin die Zelle zusätzlich über seine membranstabilisierende Wirkung. Der genaue Mechanismus ist bisher noch unbekannt, es besteht aber die Vermutung, dass dies über die ionische Bindung an die Phospholipide der Membran geschieht, wodurch deren Konformation geändert und die Membran so stabilisiert wird (DELLA CORTE, 2000).

Als Hypochlorit-Radikalfänger hat Taurin weiterhin eine antioxidative Wirkung (HUXTABLE, 1992). Außerdem hat es im humanen fötalen Gehirn eine Bedeutung als Wachstums- und Entwicklungsfaktor (AERTS *et al.*, 2002). Ein Taurinmangel während der Schwangerschaft führt zu einem verlangsamten Wachstum des Kindes und zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung des Zentralen Nervensystems. Noch im Erwachsenenalter zeigt der pränatale Taurinmangel Auswirkungen, wie die Beeinträchtigung der Glukosetoleranz oder Gefäßerkrankungen (AERTS *et al.*, 2002). Eine weitere wichtige Rolle spielt es bei der Bildung und Erhaltung von Lichtrezeptoren, was am Beispiel der Katzen deutlich wird (HAYES *et al.*, 1975). Katzen sind auf die Aufnahme von Taurin über die Nahrung angewiesen, da sie es nicht selber bilden können. Eine taurindefiziente Ernährung führt zu Degeneration der Netzhaut und letztendlich zur Erblindung.

Im Gegensatz zu anderen Aminosäuren besitzt Taurin eine Sulfon- anstelle einer Carboxylgruppe. Da die Sulfongruppe keine Peptidbindung eingehen kann, liegt Taurin zum größten Teil frei im Körper vor und ist nicht am Aufbau von Proteinen beteiligt (CHESNEY, 1985).

Als Bestandteil von Nukleinsäuren war Taurin lange unbekannt. Erst vor wenigen Jahren wurden zwei mitochondriale tRNAs entdeckt, in die Taurin eingebaut wird und deren Abwesenheit mit verschiedenen mitochondrialen Enzephalomyopathien assoziiert ist (SUZUKI *et al.*, 2002).

1.2 Taurintransporter-Knockout-Maus (*taut* *-/-*)

Zur genaueren Untersuchung der Bedeutung von Taurin für den Organismus wurde die Taurintransporter-Knockoutmaus (*taut* *-/-*) generiert (HELLER-STILB *et al.*, 2002). Den Tieren fehlt das Exon 1 des Taurintransporter-Gens (*taut*) und sie können keinen funktionellen Taurintransporter mehr bilden. Dies führt zu stark verminderten

Konzentrationen von Taurin, v.a. im Herz- und Skelettmuskel (um ~98 %), im Hirn und der Retina (um ~80-90 %). In der Leber ist der Tauringehalt um ~70 % vermindert.

Die Tiere zeigen zahlreiche, zum Teil altersabhängige Auffälligkeiten (HELLER-STILB *et al.*, 2002; WARSKULAT *et al.*, 2006). Schon in den ersten Lebenswochen ist eine Degeneration der Retina zu beobachten: die bei 2 Wochen alten Tieren noch intakte Retina degeneriert innerhalb der nächsten 2 Wochen und die Tiere erblinden (HELLER-STILB *et al.*, 2002; RASCHER *et al.*, 2004). Ergometrische Tests zeigten, dass schon 4 Monate alte *taut*^{-/-} Tiere in ihrer Leistungsfähigkeit stark eingeschränkt sind und bis zur Erschöpfung weniger als 20 % der von den Kontrolltieren zurückgelegten Strecke laufen können (WARSKULAT *et al.*, 2004). Im Gegensatz zum Skelettmuskel ist die Grundfunktion des Herzens der *taut*^{-/-} Mäuse normal, da es hier zu einer Kompensation des Taurinmangels durch verschiedene andere organische Osmolyte kommt (WARSKULAT *et al.*, 2004).

Morphologische und physiologische Untersuchungen zeigten weiterhin Auffälligkeiten an den Mitochondrien von Leber und Skelettmuskel der *taut*^{-/-} Mäuse (WARSKULAT *et al.*, 2006; LÜSEBRINK *et al.*, 2008). So ist z.B. der Atmungskontrollkoeffizient in den Mitochondrien beider Gewebe um ~30 % verringert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Leber zeigten zusätzlich stark geschädigte Mitochondrien. Die Cristae der Mitochondrien bilden Ödeme, die Matrix erscheint aufgehellt und die Mitochondrienmembran ist teilweise zerstört (WARSKULAT *et al.*, 2006). Mit zunehmendem Alter entwickeln die Tiere außerdem chronische Lebererkrankungen (WARSKULAT *et al.*, 2006). Die *taut*^{-/-} Tiere zeigen ~3mal häufiger Zeichen einer akuten oder chronischen Leberentzündung, die sich im Alter weiter verschlimmert. Außerdem zeigten über 18 Monate alte *taut*^{-/-} Mäuse in 85 % der Fälle eine Leberfibrose, während diese nur bei 18 % der altersentsprechenden Wildtyp- und ~46 % der heterozygoten Tiere zu beobachten war.

1.3 Mitochondrien

Mitochondrien werden häufig als Kraftwerke der Zelle bezeichnet, da sie den Großteil der in der Zelle benötigten Energie durch die Generierung von ATP über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) zur Verfügung stellen (ALBERTS *et al.*, 2002). Allerdings spielen sie auch bei vielen anderen Prozessen eine wichtige Rolle, u.a. bei der Apoptoseregulation, der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern, dem

Fettsäureabbau über β -Oxidation und der Kontrolle des Zellzyklusses und Zellwachstums (Alberts *et al.*, 2002; Lill *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2006). Je nach Gewebe und Organismus enthält eine Zelle bis zu 1000 Mitochondrien (Alberts *et al.*, 2002).

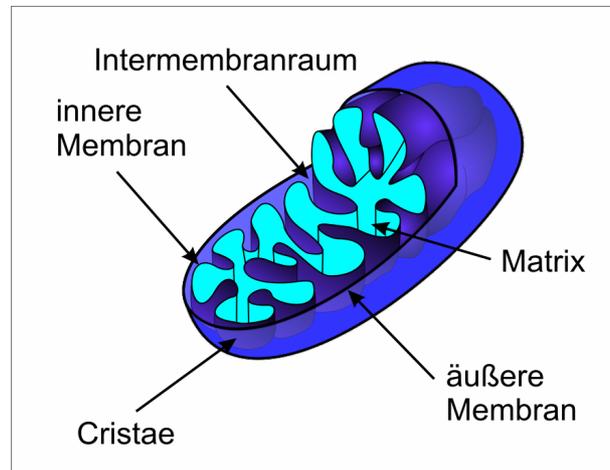


Abb. 1.2: schematische Darstellung eines Mitochondriums

Mitochondrien besitzen eine Doppelmembran (Abb. 1.2). Die äußere Membran umschließt das Mitochondrium und ist durchgängig für Ionen und kleine Moleküle. Die innere Membran ist zur Oberflächenvergrößerung in zahlreiche Falten, die so genannten Cristae, gelegt. In der Membran sitzen u.a. die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette. In der Matrix im Inneren des Mitochondriums laufen zahlreiche Prozesse, wie z.B. der Citratzyklus und die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern ab. Außerdem finden sich hier die Kopien des mitochondrialen Genoms. Für die mitochondriale Bereitstellung von Energie in Form von ATP ist die aus fünf Komplexen bestehende Atmungskette zuständig (WALLACE, 1999). Über Oxidation von NADH werden Elektronen erst auf Komplex I (NADH-Dehydrogenase, NADH-DHG) und von dort aus auf das Koenzym Q_{10} (CoQ) übertragen. Parallel dazu werden Elektronen vom Succinat aus dem Citratzyklus auf Komplex II (Succinat-Dehydrogenase, SDH) übertragen, welcher diese ebenfalls an CoQ weitergibt. Durch die Oxidation von CoQ werden die Elektronen erst auf Komplex III (Cytochrom *c* Reduktase), dann auf Cytochrom *c* (Cyt *c*) übertragen. Vom Cyt *c* gehen die Elektronen auf den Komplex IV (Cytochrom *c* Oxidase, COX) und schließlich auf $\frac{1}{2} O_2$ über, wodurch H_2O entsteht. Die Energie, die durch die Wanderung der Elektronen über die verschiedenen Komplexe entsteht, wird dafür genutzt, Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Der so entstehende

Protonengradient kann vom Komplex V (F_0 - F_1 -ATP-Synthase) zur Synthese von ATP genutzt werden (Abb. 1.3).

Alle Komplexe der Atmungskette bestehen aus mehreren Untereinheiten, die bis auf Komplex II sowohl im Kern als auch im Mitochondrium kodiert werden. Nur die SDH wird ausschließlich im Kern kodiert (SUN *et al.*, 2005).

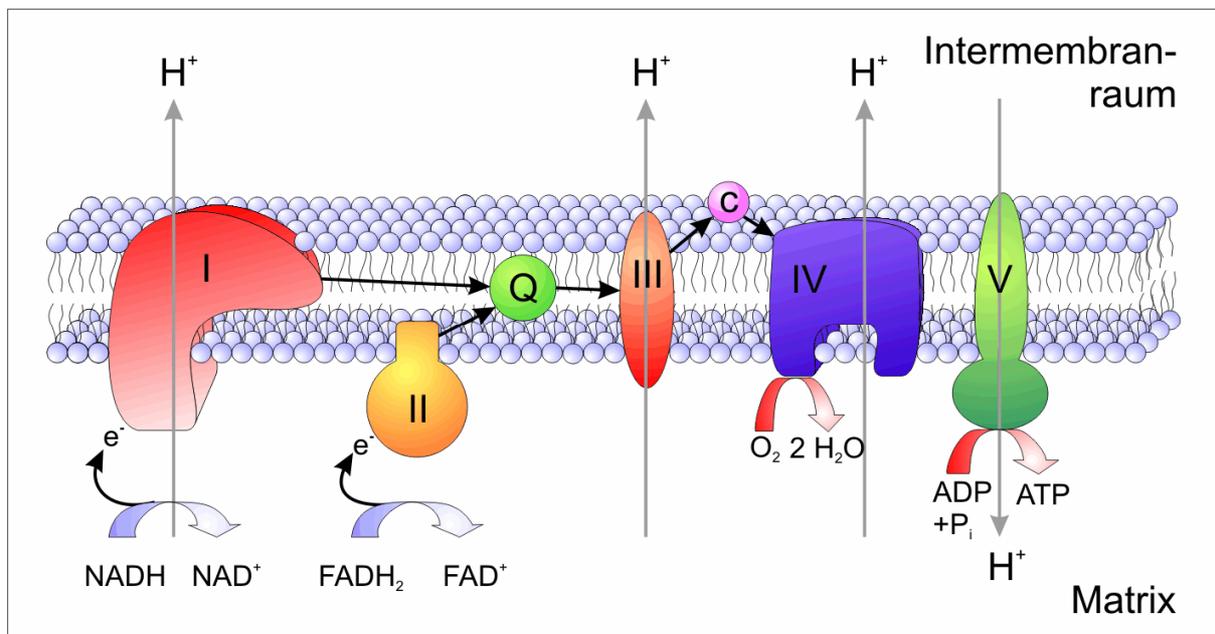


Abb. 1.3: Die mitochondriale Atmungskette. Fünf Komplexe bilden die Atmungskette (I-V). Von NADH bzw. $FADH_2$ werden Elektronen auf die Komplexe I bzw. II übertragen. Die Elektronen wandern über die verschiedenen Komplexe (schwarze Pfeile) bis sie schließlich an Komplex IV auf $\frac{1}{2} O_2$ übertragen werden. Die durch den Elektronentransport freigesetzte Energie wird zum pumpen von Protonen in den Intermembranraum genutzt, welche wiederum vom Komplex V zur Generierung von ATP genutzt wird. c: Cytochrom c, Q: Koenzym Q_{10}

Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom, welches in 2-10 Kopien pro Mitochondrium vorliegt (WIESNER *et al.*, 1992). Die murine mitochondriale DNA (mtDNA) besteht aus 16.295 Basenpaaren und enthält 37 Gene. Davon kodieren 13 für Proteine der Atmungskette, 22 für die mitochondrialen tRNAs und 2 für die 12S und 16S rRNAs (BIBB *et al.*, 1981). Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird allerdings im Kern kodiert und nach der Translation in das Mitochondrium hineintransportiert. Die mtDNA enthält keine Introns, außerdem benutzt sie einen alternativen genetischen Code (ANDERSON *et al.*, 1981; JUKES *et al.*, 1990).

Mutationen der mtDNA sind in zahlreiche degenerative Erkrankungen und im Alterungsprozess involviert (WALLACE, 1999). Die Mutationsrate der mtDNA ist im Vergleich zur nukleären DNA stark erhöht. Dies ist zum einen auf das Fehlen von

Histonen und ineffizienten Reperaturmechanismen und zum anderen auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Mitochondrium zurückzuführen (SHIGENAGA *et al.*, 1994; CROTEAU *et al.*, 1999). Nach der ‚Theorie der freien Radikale‘ (HARMAN, 1956, 2003) verursachen ROS Mutationen an der mtDNA. Dies führt zu einer Störung der mitochondrialen Atmungskette und letztendlich zu vermehrter Bildung von weiteren ROS. Durch diesen ‚Teufelskreis‘ verstärkt sich die Konzentration an ROS, die oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und Nukleotiden verursachen. ROS und die dadurch verursachten Schäden sind mit zahlreichen Krankheitsbildern assoziiert, darunter sind z.B. Diabetes, Atherosklerose, Parkinson (PALACINE *et al.*, 2004; NISHIKAWA *et al.*, 2007; SCHLEICHER *et al.*, 2007).

1.4 Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit

Stickstoffmonoxid (NO) und seine Derivate können wie ROS ebenfalls einen großen Einfluss auf Mitochondrien haben, indem sie z.B. die mitochondriale Atmung hemmen oder, je nach Bedingung, Apoptose inhibieren oder herbeiführen können (BROWN *et al.*, 2002).

NO wird im Gewebe aus L-Arginin von drei verschiedenen Isoformen der NO-Synthase (NOS) gebildet. Die endotheliale (eNOS) und die neuronale (nNOS) Form werden konstitutiv exprimiert, während die induzierbare Form (iNOS) erst bei Inflammation aktiviert wird und größere Mengen NO über einen längeren Zeitraum freisetzt (IGNARO, 2000). Außerdem soll es noch eine vierte Isoform geben: eine mitochondriale NOS (mtNOS). Bisher konnte sie jedoch nicht identifiziert werden und ihr Vorhandensein bleibt stark umstritten (GHAFOURIFAR *et al.*, 2001; SCHILD *et al.*, 2003; LACZA *et al.*, 2003; CASTELLO *et al.*, 2006).

NO ist ein relativ langlebiges Radikal (2-3 sek). Als ungeladenes lipophiles Molekül kann es leicht durch biologische Membranen diffundieren und so in das Mitochondrium gelangen (DENICOLA *et al.* 1996).

In physiologischen Konzentrationen ist NO relativ unreaktiv. Es kann jedoch mit anderen Molekülen in eine Reihe von Derivaten umgewandelt werden, die als reaktive Stickstoffspezies (RNS) bezeichnet werden (Brown *et al.*, 2002). Dazu gehören z.B. Stickstoffdioxid und Peroxynitrit. RNS vermitteln nitrosative Schäden, die, ähnlich wie ROS, durch strukturelle Veränderungen von Proteinen oder

Inhibierung von Enzymen zu altersabhängigen Erkrankungen führen (Drew *et al.*, 2002).

Das Peroxynitritanion (ONOO^-) wird in einer diffusionskontrollierten Reaktion ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zwischen den beiden Radikalen Stickstoffmonoxid und Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot -}$) gebildet (KISSNER *et al.*, 1997) (Abb. 1.4). Peroxynitrit vermittelt mitochondriale Schäden hauptsächlich durch Oxidation, weiterhin durch Nitrierung und zu einem geringeren Maß durch Nitrosierungen von mitochondrialen Proteinen (Radi *et al.*, 2002b). Während Oxidationen häufig auf direkte Reaktionen zurückzuführen sind, verlaufen Nitrierungen und Nitrosierungen gewöhnlich über die Bildung von freien Radikalen. Durch die Reaktion von Peroxynitrit mit Kohlendioxid ($k = 4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 37°C) kommt es zur schnellen Bildung von Stickstoffdioxid ($\cdot\text{NO}_2$) und Carbonatradikal ($\text{CO}_3^{\cdot -}$) (DENICOLA *et al.*, 1996). Das Carbonatradikal reagiert mit Tyrosinresten zum Tyrosylradikal, welches wiederum mit dem Stickstoffdioxid zum 3-Nitrotyrosin reagiert (Abb. 1.4). Die Reaktion mit CO_2 spielt vor allem im Mitochondrium eine wichtige Rolle, da im Citratzyklus große Mengen davon entstehen (RADI *et al.*, 2002a).

Verstärkte Protein-Tyrosin-Nitrierungen wurden bei verschiedenen altersassoziierten Krankheiten beobachtet, wie z.B. Diabetes, Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen (BECKMANN *et al.*, 1994; CERIELLO *et al.*, 2002; TURKO *et al.*, 2002).

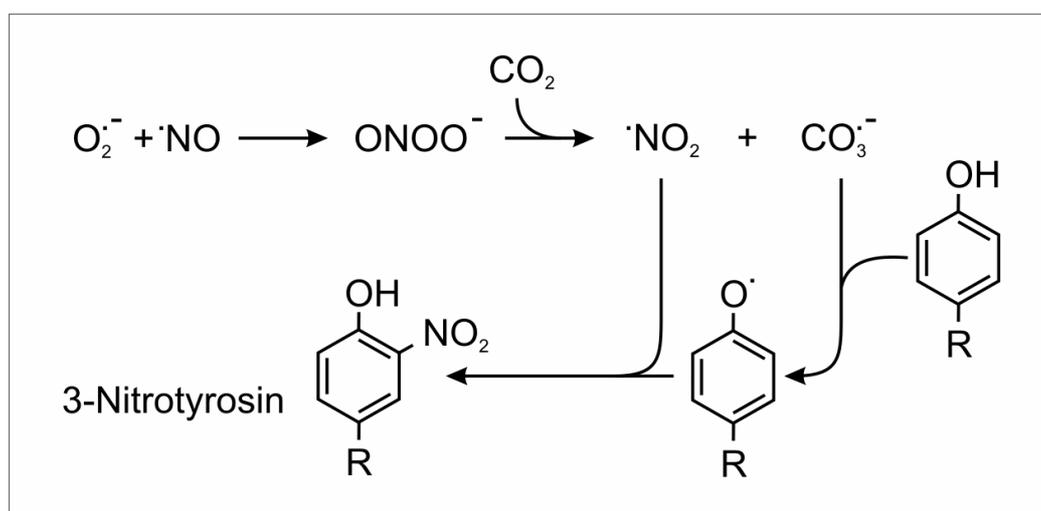


Abb. 1.4: Protein-Tyrosin-Nitrierung. Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot -}$) und Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) reagieren zu Peroxynitrit (ONOO^-). Dies reagiert in Anwesenheit von Kohlendioxid zu Stickstoffdioxid und Carbonatradikal, welches zusammen mit Tyrosinresten das Tyrosylradikal bildet. Die Reaktion zwischen dem Tyrosylradikal und Stickstoffdioxid führt letztendlich zur Nitrierung des Proteins.

1.5 Zielsetzung

Vorangegangene Untersuchungen an der Taurintransporter-Knockoutmaus (*taut*^{-/-}) haben gezeigt, dass Taurinmangel zu einer veränderten Morphologie und Physiologie von Mitochondrien führt (WARSKULAT *et al.*, 2006). Im Verlauf der Arbeit sollten diese Veränderungen näher charakterisiert werden, insbesondere sollte der Einfluss des Taurinmangels auf das mtGenom sowie die mitochondriale Atmungskette untersucht werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob und welchen Einfluss Taurinmangel auf mitochondriale Schäden durch reaktive Stickstoffspezies hat.

Für die Untersuchungen des mitochondrialen Genoms sollte eine Methode zum Nachweis von Deletionen der mtDNA in Skelettmuskel, Leber und Herz über quantitative Real-time-PCR im Maussystem etabliert werden.

Für die Analyse der Atmungskette und weiterer mitochondrialer Proteine sollten Mitochondrien aus Leber und Skelettmuskel isoliert werden. Mit den isolierten Mitochondrien sollten dann verschiedene Aktivitätsassays durchgeführt werden, um die Funktionalität der Mitochondrien, insbesondere die der Atmungskette zu überprüfen. Weiter sollte über Western Blot-Analyse die Expression verschiedener mitochondrialer Proteine bestimmt werden.

Der Einfluss von RNS auf die Mitochondrien der Taurintransporter-Knockoutmaus sollte sowohl im Western Blot durch den Einsatz eines spezifischen Nitrotyrosin-Antikörpers, als auch über Fluoreszenzmessungen mit Hilfe des Farbstoffes DAF-FM überprüft werden.

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass es im Gegensatz zum Skelettmuskel im Herzmuskel von *taut*^{-/-} Mäusen zu Kompensationsmechanismen bezüglich des Taurinmangels kommt. Über DNA-Mikroarray-Analyse sollte deshalb ein Profil der mRNA-Expression im Herzen der *taut*^{-/-} Mäuse im Vergleich zum Wildtyp erstellt werden. Hierdurch sollten die Kompensationsmechanismen näher charakterisiert und Hinweise auf eine eventuell vorhandene veränderte Expression von Stressfaktoren erhalten werden.

2 Material und Methoden

2.1 Enzyme und Chemikalien

- Acetyl-Koenzym A: AppliChem, Darmstadt
- Acrylamid 4K-Lösung (30 %) Mix 29:1: AppliChem, Darmstadt
- Agarose: Eurogentec, Köln
- Ammoniumperoxodisulfat (APS): Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
- BSA (Rinderserumalbumin), Fraktion V: Roth, Karlsruhe
- *Complete Protease-Inhibitor-Cocktail* (Tabletten): Roche, Mannheim
- Cytochrom c Oxidase-Assay Kit: Sigma-Aldrich, Steinheim
- DTNB, AppliChem, Darmstadt
- HyperfilmTM: Amersham: Little Chalfont, Buckinghamshire, GB
- Kaliumzyanid (KCN): Sigma-Aldrich, Steinheim
- L-NMMA: Sigma-Aldrich, Steinheim
- Myxothiazol: Sigma-Aldrich, Steinheim
- n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid: Sigma-Aldrich, Steinheim
- *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG*: Invitrogen, Karlsruhe
- Protran[®] Nitrozellulose Transfer Membran: Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
- Rotenon: Sigma-Aldrich, Steinheim
- *SYBR[®] Green PCR Master Mix*: Applied Biosystems, Warrington, GB
- Taq DNA Polymerase und der zugehörige 10 \times Puffer: Qiagen, Hilden
- Triton X-100: Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
- Valinomycin: Sigma-Aldrich, Steinheim
- *Western LightningTM Chemiluminescence Reagent Plus*: Perkin Elmer Lifesciences, Boston, USA
- Citratsynthase, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Weitere Chemikalien für das molekularbiologische Labor im höchsten Reinheitsgrad: Merck, Darmstadt; Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim; MP Biomedicals, Eschwege; AppliChem, Darmstadt; Serva, Heidelberg

2.2 Oligonukleotide

Für die Genotypisierung und die Real-time-PCR wurden Oligonukleotide der Firma MWG Biotech (Ebersberg) verwendet.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Oligonukleotide. In der Tabelle sind alle in der Arbeit verwendeten Primer mit Verwendungszweck aufgeführt.

| Bezeichnung | Sequenz | Verwendung |
|--------------|--|-----------------|
| PL48 forward | 5'-CGC TCT ACC TCA CCA TCT CTT-3' | Real-time-PCR |
| PL48 reverse | 5'-GCT ACA CCT TGA CCT AAC GTT-3' | Real-time-PCR |
| D1 forward | 5'-CCT CCA ACA GGA ATT TCA CC-3' | Real-time-PCR |
| D1 reverse | 5'-CGC GGT TTT GTT ATT GTT ACG-3' | Real-time-PCR |
| D3 forward | 5'-TCC CTA ACG CTA ATT CTA-3' | Real-time-PCR |
| D3 reverse | 5'-GCG GTG AAT AAT AGA TGG GAA A-3' | Real-time-PCR |
| D13 forward | 5'-CAC CCT CCT AGT AAG CCT AT-3' | Real-time-PCR |
| D13 reverse | 5'-GGA GAT TGG TTG ATG TAT GA -3' | Real-time-PCR |
| TautEx1.2 | 5'-AAG CCT TCT CCA GGG AAG AG-3' | Genotypisierung |
| TautEx1r | 5'-CCA CAG ACA GCA CAA AGT C-3' | Genotypisierung |
| TEX25/2 | 5'-CGT CAT TGT GTC CCT CCT G-3' | Genotypisierung |
| TautEx2r | 5'-TGA GGT GGA GTT GGC AGT GCT-3' | Genotypisierung |
| TautNeo2 | 5'-CAG GGT ATA CCT GGA CTG GG-3' | Genotypisierung |
| Neo2 | 5'-GAC AGA ATA AAA CGC ACG GG-3' | Genotypisierung |
| ANF for | 5'-TCG TCT TGG CCT TTT GGC T-3' | mRNA-Analyse |
| ANF rev | 5'-TGT ACA CAG GAT TTG CTC CAA TAT G-3' | mRNA-Analyse |
| Acta1 for | 5'-GTT CGC GCT CTC TCT CCT CA-3' | mRNA-Analyse |
| Acta1 rev | 5'-GCA ACC ACA GCA CGA TTG TC-3' | mRNA-Analyse |
| Acta2 for | 5'-CCC TGA AGA GCA TCC GAC AC-3' | mRNA-Analyse |
| Acta2 rev | 5'-GCC TTA GGG TTC AGT GGT GC-3' | mRNA-Analyse |
| Actg1 for | 5'-TAC AAT GAG CTG CGT GTG GC-3' | mRNA-Analyse |
| Actg1 rev | 5'-CTC GGT CAG AAG CAC CGG-3' | mRNA-Analyse |
| Actg2 for | 5'-CAG GGT GTG ATG GTG GGA AT-3' | mRNA-Analyse |
| Actg2 rev | 5'-CTC GTC CCC CAC ATA GCT GT-3' | mRNA-Analyse |
| Actc1 for | 5'-TTC TAC AAT GAG CTC CGT GTG G-3' | mRNA-Analyse |
| Actc2 rev | 5'-AGT GAG CAG GGT TGG GTG TT-3' | mRNA-Analyse |
| HPRT for | 5'-GCT TCC TCC TCA GAC CGC TT-3' | mRNA-Analyse |
| HPRT rev | 5'-TTA GGT ATA CAA AAC AAA TCT AGG TCA TAA CC-3' | mRNA-Analyse |

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Nachfolgend sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Antikörper mit einer 1:5000 Verdünnung in 5 % BSA/TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Tween-20, pH 7,6) eingesetzt.

- Komplex I Untereinheit NDUF6, monoklonaler Antikörper (Mitosciences, Eugene, USA)
- Komplex II, 30 kD Untereinheit, monoklonaler Antikörper (Mitosciences, Eugene, USA)
- Komplex IV Untereinheit I, monoklonaler Antikörper (Mitosciences, Eugene, USA)
- Anti-Cytochrom c, polyklonaler Antikörper (Abcam, Cambridge, GB)
- Anti-Glutathion-Peroxidase I, polyklonaler Antikörper (LabFrontier, Seoul, South Korea)
- Anti-Superoxid-Dismutase II, polyklonaler Antikörper (LabFrontier, Seoul, South Korea)
- Anti-Katalase, polyklonaler Antikörper (LabFrontier, Seoul, South Korea)
- Anti-Nitrotyrosin, Klon 1A6, monoklonaler Antikörper (Upstate, Lake Placid, USA)
- *anti alpha-smooth muscle actin*, monoklonaler Antikörper (Chemicon, Hampshire, GB) (1:1000)

2.3.2 Sekundärantikörper

Die eingesetzten Sekundärantikörper wurden mit einer Verdünnung von 1:10.000 in 5 % BSA/TBST eingesetzt.

- Amersham ECLTM Anti-Maus IgG, Meerrettich Peroxidase gekoppelter Antikörper (aus dem Schaf) (GE Healthcare, Freiburg)
- Amersham ECLTM Anti-Kaninchen IgG, Meerrettich Peroxidase gekoppeltes F(ab')₂ Fragment (aus dem Esel) (GE Healthcare, Freiburg)

2.4 Versuchstiere

Die Taurintransporter-Knockoutmaus (*taut*^{-/-}, *taut*^{+/-}) wurde über homologe Rekombination generiert und besitzt eine gemischte genetische Herkunft (C57Bl/6 × 129/SvJ) (HELLER-STILB *et al.*, 2002). Wildtypiere (*taut*^{+/+}) dienten als Kontrollen und haben den gleichen genetischen Hintergrund wie die *taut*^{-/-} Mäuse. Die Tiere wurden bei einem 12:12 h hell/dunkel Zyklus in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Den Tieren stand Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Alle Versuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

2.4.1 Genotypisierung

Aus Schwanzbiopsien wurden mit Hilfe des *DNeasy*[®] *Blood and Tissue Kits* (Qiagen, Hilden) DNA isoliert. Die DNA wurde mittels PCR analysiert. 2 µl Gesamt-DNA wurden zu einem 50 µl PCR-Ansatz (*Coral Load* PCR Puffer, Q-Solution, 50 nM dNTPs, je 1 pM Kontroll- und 1,5 pM Genotypisierungsprimer, 1,5 U Taq Polymerase) gegeben. Dieser Ansatz wurde mit folgendem PCR-Programm im *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) inkubiert: 5 min bei 94 °C, darauf folgten 45 Zyklen mit 1 min bei 94 °C, 1 min bei 57 °C und 1 min 72 °C. Abschließend folgte noch ein Schritt von 8 min bei 72 °C.

Mit dem Primerpaar TautEx1.2/TautEx1r wird das Exon 1 des *taut* Gens amplifiziert. Dadurch ist es möglich zwischen *taut*^{+/-} und *taut*^{-/-} Tieren zu unterscheiden. Zur Unterscheidung von +/- und +/+ Tieren wurde das Primerpaar TautNeo2/Neo2 (Tabelle 2.1) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Primerpaars wird ein 117 bp großes Fragment der veränderten DNA nachgewiesen. Wird kein Amplifikat gebildet, handelt es sich um ein Wildtypier. Als interne Kontrolle wurde in allen PCRs das Primerpaar TautEx2r / TEX25/2 eingesetzt.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese in einer horizontalen Flachbettkammer nach SAMBROOK *et al.* (2001).

Die DNA wurde auf 2 %ige Agarosegele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 3-4 V/cm. Als Laufpuffer und für die Herstellung der Gele wurde TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1,6 mM EDTA pH 8,0) verwendet.

2.5 Nachweis von mitochondrialen DNA-Deletionen mittels quantitativer Real-time-PCR

Aus Oberschenkelmuskulatur, Lebern und Herzen sowohl 2 Monate alter *taut*^{-/-}, *taut*^{+/-} und Wildtypmäusen (jeweils n=5) als auch 15-16 Monate alter *taut*^{-/-} (n=14), *taut*^{+/-} (n=11) und Wildtypmäusen (n=11) wurde DNA mit Hilfe des DNeasy[®] Blood and Tissue Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA-Analyse erfolgte anschließend über eine quantitative Real-time-PCR. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des DNA-Farbstoffes SYBR[®] Green. SYBR[®] Green interkaliert mit der doppelsträngigen DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt. Die Zunahme der amplifizierten DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Die PCR wurde mit dem Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für einen 25 µl Ansatz wurden 100 ng DNA und je 2,5 µM der sequenzspezifischen Primer eingesetzt (Tabelle 2.1). Die Real-time-PCR wurde in einem ABI 7500 Real Time PCR System mit folgendem Programm durchgeführt: 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C, danach folgten 45 Zyklen mit 15 sek bei 95 °C und 1 min bei 55 °C. Die Fluoreszenz wurde nach jedem abgeschlossenen Zyklus gemessen. Im Anschluss an jede PCR wurde zur Überprüfung der Amplikons eine Schmelzkurve erstellt.

2.6 DNA-Microarray-Hybridisierung

2.6.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) aus Herzen von *taut*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen isoliert und über RNeasy Säulen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Zur Herstellung der fluoreszierenden cDNA wurden 25 µg Gesamt-RNA und 0,5 µg oligo(dT)₂₀ Primer (Invitrogen) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde erst 5 min bei 70 °C und dann 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde *first-strand* Puffer (Invitrogen), 10 mM DTT, 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP), 80 µM dTTP, 20 U RNaseout (Invitrogen), 200 U Superscript III (Invitrogen) und 40 µM Cy3- oder Cy5-dUTP (Amersham, Freiburg) zugegeben. Die reverse Transkription wurde bei 46 °C für 2 h durchgeführt, bevor die Reaktion mit 50 mM EDTA gestoppt wurde. Nach der Zugabe von 25 mM Natriumhydroxid wurde der Ansatz 15 min bei 37 °C inkubiert, um die RNA zu hydrolysieren. Danach wurde der Mix mit 600 mM HEPES neutralisiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von QIAquick PCR

purification columns (Qiagen) entfernt. Die Markierungseffizienz wurde über NanoDrop-Messungen (PeqLab, Erlangen) ermittelt.

2.6.2 Array-Analyse

Amino-modifizierte 70mer Oligonukleotide wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) bzw. Operon (Köln) bezogen.

Die Erstellung der Oligonukleotide wurden von Operon mit *OligoWiz 1.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/OligoWiz/>) durchgeführt.

Die Oligonukleotide (50 μ M) wurden in *QMT Spotting Solution II* (Quantifoil, Jena) mit einem GMS 417 *pin-and-ring arrayer* (Affymetrix, Santa Clara, USA) auf Epoxy-Glas-Slides (Eppendorf, Wesseling) gespottet. Die Blockierung reaktiver Gruppen wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Slides wurden in einem automatischen Slide Prozessor (ASP, Amersham) prozessiert und mit 5 \times SSC (*saline sodium citrat*; 1 \times SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0), 0,1 % SDS, 1 % BSA für 1 h bei 42 °C vorinkubiert. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend in 5 \times SSC, 0,1 % SDS, 40 % Formamid für 16 h bei 42 °C hybridisiert. Die folgenden 10 minütigen Waschschrte mit 2 \times SSC/0,1 % SDS, 1 \times SSC und 0,5 \times SSC wurden bei 30 °C durchgeführt. Abschließend wurden die Slides getrocknet und gescannt (FLA800, Fuji, Valhalla, USA)

Die gescannten Bilder wurden mit dem *Aida Image Analyzer v.3.50* (Raytest, Straubenhardt) analysiert. Zur Normalisierung wurden die oberen und unteren 20 % des Signals ausgeschlossen und die verbleibenden Signale wurden für die Normalisierungsannäherung eingesetzt. Die Normalisierung wurde unabhängig für jeden Kanal durchgeführt. Zweifarbige Hybridisierungen wurden mit *Aida Array Compare v.3.50* (Raytest) verglichen.

Die Durchführung der RNA-Isolation und der anschließenden Array-Analyse wurden von Frau Dr. Birgit Andrée im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

2.7 Genexpressionsanalyse über Real-time-PCR

Aus Herzen von 2 Monate alten *taut+/+* und *taut-/-* Tieren wurde Gesamt-RNA mit Hilfe des *RNeasy[®] Kits* (Qiagen, Hilden) isoliert. Mit einem Erststrang cDNA-Synthese Kit (Roche, Mannheim) erfolgte anschließend die Synthese von cDNA.

Die Analyse der Genexpression wurde über Real-time-PCR im *ABI 7500 Real Time PCR System* durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit *SYBR GreenTM* (Applied Biosystems, Warrington, GB) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C, danach folgten 40 Zyklen mit 15 sek bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss an die PCR über die Erstellung einer Schmelzkurve überprüft. Die Genexpressionsanalysen wurden von Herrn PD Dr. Ulrich Warskulat durchgeführt.

2.8 Mitochondrienisolation

Mitochondrien wurden über differentielle Zentrifugation nach einer abgewandelten Methode von SMITH (1967) isoliert und angereichert. Frisch isoliertes Gewebe von *taut-/-*, *taut+/-* und Wildtyp-Mäusen wurden mit der Schere in ca. 2 mm große Stücke zerkleinert. Diese wurden in einen gekühlten Potter-Elvehjem Glas-Teflon-Homogenisator überführt. 4 ml Mitochondrienisolationpuffer (MI-Puffer: 0,2 mM EDTA, 0,25 M Sucrose, 10 mM Tris, pH 7,4) wurden zugegeben, dann wurde das Gewebe mit ca. 20 Stößen homogenisiert.

Das entstandene Homogenat wurde in gekühlte Zentrifugenröhrchen überführt. Die Homogenisatoren wurden mit 6 ml MI-Puffer gespült. Anschließend erfolgte die erste Zentrifugation bei 1.000 × g für 10 min bei 4 °C (Beckman AvantiTM J-25 Zentrifuge, JA 25.5 Rotor). Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und bei 12.000 × g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml MI-Puffer mit Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim) resuspendiert und erneut bei 12.000 × g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt.

Abschließend wurde das Pellet in 200-500 µl MI-Puffer mit Protease-Inhibitor aufgenommen. Die Proteinbestimmung erfolgte über den BioRad-Assay (Kapitel 2.9.2).

2.9 Proteinanalyse

2.9.1 Präparation von Proteinen aus Mitochondrien

Nach Isolation der Mitochondrien wurden Teile der Mitochondrienfraktion (z.B. 100 µl) mit der gleichen Menge RL-Puffer (20 mM Tris pH 7,4, 140 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM Natriumpyrophosphat × 10·H₂O, 0,1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 20 mM β-Glycerophosphat) versetzt und kurz gemischt. Die Proben wurden 30 min im Eisbad mit Ultraschall behandelt und anschließend 5 min bei 16.000 × g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415 R). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach BRADFORD (1976) mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays (BioRad, München). Für die Messung wurden je 5 µl Probe, 795 µl dH₂O und 200 µl Bradfordreagenz in einer Einwegküvette gemischt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm in einem LKB Biochrom Ultrospec Plus Photometer (Biochrom, Cambridge, GB) gemessen. Durch den Vergleich mit einer BSA-Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.9.3 Präparation von Proteinen für die SDS-PAGE

Nach Bestimmung der Proteinmenge wurde die gewünschte Menge Protein (25-50 µg) mit der entsprechenden Menge Ladungspuffer (85 mM Tris pH 6,8, 1,85 M Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau, 3,5 % SDS, 200 mM DTT) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Abschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.9.4 SDS-PAGE

Proteine wurden elektrophoretisch in einer vertikalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach LÄMMLI (1970) aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurde die Prozentigkeit der Polyacrylamidgele variiert (Tabelle 2.2).

Die Proben wurden wie in Kapitel 2.9.3 beschrieben vorbereitet und auf das Sammelgel aufgetragen. Als Größenstandard wurden *Rainbow Marker (Full Range)* (Amersham, Freiburg) und *Precision Plus Dual Color* (BioRad, München) verwendet.

Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Flachgelapparatur in 25 mM Tris, 4 mM SDS, 250 mM Glycin für 1-3 h durchgeführt. Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 8 V/cm angelegt. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 15 V/cm. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt. Das Trenngel wurde für die Western Blot-Analyse verwendet (siehe Kapitel 2.9.6).

Tabelle 2.2: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

In der Tabelle sind die Zusammensetzungen von Polyacrylamid (PAA)-Gelen aufgeführt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die enthaltene Menge PAA.

| Trenngel | 8 % | 10 % | 12 % | 15 % | Sammelgel | 5 % |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|-------------------|---------|
| PAA-Lösung (30%) | 8,0 ml | 10,0 ml | 12,0 ml | 15,0 ml | PAA-Lösung (30 %) | 3,4 ml |
| dH ₂ O | 13,9 ml | 11,9 ml | 9,9 ml | 6,9 ml | dH ₂ O | 13,6 ml |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 7,5 ml | 7,5 ml | 7,5 ml | 7,5 ml | 1 M Tris (pH 6,8) | 2,5 ml |
| 10 % SDS (w/v) | 300 µl | 300 µl | 300 µl | 300 µl | 10 % SDS (w/v) | 200 µl |
| 10 % APS (w/v) | 300 µl | 300 µl | 300 µl | 300 µl | 10 % APS (w/v) | 200 µl |
| TEMED | 12 µl | 12 µl | 12 µl | 12 µl | TEMED | 20 µl |

2.9.5 Färbung von Gelen nach SDS-PAGE

Zum direkten Nachweis der aufgetrennten Proteine im Gel wurde dieses mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Um das SDS zu entfernen, wurde das Gel zuerst mit dH₂O gewaschen, bevor es bis zu 1 h mit Coomassie-Färbelösung (0,05 % w/v Coomassie Brilliant Blau R-250, 40 % Ethanol, 10 % Eisessig) inkubiert wurde. Anschließend wurde das Gel unter Schütteln und im 30minütigen Wechsel von dH₂O gewaschen, bis die überschüssige Farbe entfernt war.

2.9.6 Western Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel wurden sie durch die *semi-dry-Blot-Methode* (KYSE-ANDERSON, 1984) auf eine Nitrozellulosemembran (*Protran Nitrocellulose Transfer Membrane*, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurde das kontinuierliche Puffersystem nach BJERRUM UND SCHAFFER-NIELSEN (1986) verwendet. Die Filterpapiere (Whatman,

Maidstone, GB) zwischen den Graphitelektroden werden dabei mit einem einheitlichen Transferpuffer getränkt und dienen als Pufferreservoir.

Die Blots wurden wie folgt aufgebaut: Auf die untere Graphitplatte (Anode) der Blotapparatur (Fast Blot, Biometra, Göttingen) wurden fünf Lagen Filterpapier gelegt. Darauf wurden die Nitrozellulosemembran, das PAA-Gel und schließlich fünf weitere Filterpapiere platziert. Alle Komponenten wurden zuvor mit Blotting Puffer (50 mM Tris, 1 mM SDS, 40 mM Glycin, 20 % Methanol) getränkt. Den äußeren Abschluss bildete die Kathode der Blotapparatur. Es wurde eine Stromstärke von 1 mA pro cm² angelegt. Der Proteintransfer wurde nach einer Transferzeit von 1-2 h beendet.

2.9.7 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran 10 min mit 5 % BSA/TBST blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem in 5 % BSA/TBST entsprechend verdünnten Erstantikörper 2 h bei RT, bzw. üN bei 4 °C inkubiert. Danach folgten zwei 10minütige Waschschriffe mit TBST, bevor die Membran mit dem ebenfalls in 5 % BSA/TBST verdünnten Zweitantikörper für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Membran wurde erneut zweimal 10 min mit TBST gewaschen.

Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (Perkin Elmer, Boston, USA). Die Exposition erfolgte auf einem ECL-Hyperfilm (Amersham, Freiburg) für 1 sek bis 10 min.

2.10 Immunpräzipitation

Mit Hilfe des *Complex I Immunocapture Kit* (Mitosciences, Eugene, USA) wurde der NADH-Dehydrogenase-Komplex aus zuvor isolierten Mitochondrien präzipitiert.

Einer Mitochondriensuspension von 5 mg/ml Protein in PBS wurde 1/10 Volumen 10 % Lauryl-Maltosid zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend 30 min bei 16.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim) wurde zugegeben.

200 µl des Lysats wurden mit 3 µl Agarosebeads üN bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Agarosebeads wurden 1 min bei 1.000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, bevor die

Agarosebeads gewaschen wurden. Dazu wurden 300 µl IP-Waschpuffer (1 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosid/PBS) zugegeben. Die Agarosebeads wurden dann 5 min auf dem Überkopfschüttler bei RT inkubiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert, bevor der Puffer wieder abgenommen wurde. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Zur Elution des präzipitierten Komplexes wurden 20 µl Glycin-Elutionspuffer (0,2 M Gycin, 1 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosid) auf die Beads gegeben und 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde anschließend noch zweimal wiederholt.

Die eluierte Probe hat einen sehr niedrigen pH-Wert, der neutralisiert werden muss, bevor die Probe über SDS-PAGE aufgetrennt werden kann. Dazu wurde Ladungspuffer (85 mM Tris pH 6,8, 1,85 M Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau, 3,5 % SDS, 200 mM DTT) zugegeben. Der blaue Puffer färbt sich durch den niedrigen pH-Wert gelb. Zur Neutralisation wurde 1 M Tris (pH 7,5) in 5 µl-Schritten zugegeben, bis die Lösung sich wieder blau färbte.

2.11 Aktivitätstests

2.11.1 JC-1-Assay

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurde mit Hilfe des JC-1-Assay Kits (Sigma-Aldrich, Steinheim) durchgeführt.

50 µg isolierte Mitochondrien pro Vertiefung wurden auf eine 96-well Platte (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Nach Zugabe der Farbstofflösung wurde sofort die Fluoreszenz bei Ex/Em=490/590 nm gemessen. Als Kontrolle wurden die Mitochondrien vor der Fluoreszenzmessung mit 500 nM Valinomycin inkubiert.

2.11.2 Cytochrom c Oxidase-Aktivität und Bestimmung der mitochondrialen Membranintegrität

Der Nachweis der Cytochrom c Oxidase-Aktivität erfolgte kolorimetrisch mit Hilfe des Cytochrom c Oxidase-Assay Kits (Sigma-Aldrich, Steinheim).

Der Nachweis basiert auf der Beobachtung, dass die Absorption von Ferrocytochrom c bei 550 nm abnimmt, wenn es von der Cytochrom c Oxidase zu Ferricytochrom c oxidiert wird.

Weiterhin wurde mit Hilfe des Kits die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran bestimmt. Dazu wurde die Cytochrom c Oxidase-Aktivität mit und ohne Zugabe von n-Dodecyl- β -D-Maltosid gemessen. Die Ratio der Aktivität mit und ohne Detergenz ist ein Maß für die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran, da diese eine Barriere für das Eintreten von Cytochrom c in das Organell darstellt.

2.11.3 Citratsynthase-Assay

Die Aktivität der Citratsynthase wurde nach der Methode von SRERE (1963) durchgeführt. 10 % DTNB-Lösung (1 mM DTNB/1 M Tris-HCl pH 8,1), 5 % Oxalacetat-Lösung (10 mM Oxalacetat in 0,5 M Triethanolamin pH 8,0, 5 mM EDTA), 0,25 % Triton X-100 und 0,3 mM Acetyl-Koenzym A wurden in einer Küvette vorsichtig gemischt und 5 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde 25 μ g Mitochondrienprotein zugegeben, erneut vorsichtig gemischt und die Extinktion sofort bei 412 nm über 3 min gemessen. Das Endvolumen der Reaktionslösung betrug 1 ml. Als Standard wurde Citratsynthase (≥ 100 U/mg Protein, 1:500 in 0,1 M Tris pH 7,0 verdünnt) eingesetzt.

2.12 DAF-FM Fluoreszenz-Messung

Die Messung von Stickstoffradikalen im isolierten Mitochondrium erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAF-FM DA (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoreszeindiacetat).

0,5 μ g/ μ l Mitochondrien pro Vertiefung wurden auf eine *96-well* Platte (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Anschließend wurde 1 μ l 100 mM DAF-FM Lösung zugegeben und die Fluoreszenz bei Ex/Em=485/538 über die Zeit im *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) aufgenommen.

Für die Farbstoffkontrolle wurde DAF-FM DA mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNOC (S-Nitrocystein: 100 mM Stammlösung: 100 mM Cystein-HCl, 100 mM NaNO₂, 40 mM HCl, 30 mM NaOH), ONOO⁻ und H₂O₂ inkubiert, bevor die Fluoreszenz im Fluorimeter gemessen wurde.

2.13 Lightscattering

Die Messung der mitochondrialen Schwellung erfolgte über das so genannte *Lightscattering* (GOGVADZE *et al.*, 2004).

Isolierte Mitochondrien wurden in Mitochondrienpuffer (0,25 mM Sucrose, 10 mM Tris, pH 7,4) mit Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim) aufgenommen. In einer Küvette wurde 1 ml KCl-Puffer (150 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 5 mM Succinat, 5 mM Tris pH, 7,4) vorgelegt und anschließend 500 μg Probe zugegeben. Dann wurde die Extinktion bei 540 nm im Photometer gemessen. Nach 1 min wurden dann die jeweiligen Chemikalien zur Stimulation zugegeben.

2.14 statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm S.E.M (Standardabweichung vom Mittelwert) von mindestens $n=3$ dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der Student's t-test durchgeführt. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bezeichnet. Bei Messungen über einen Zeitraum hinweg wurde der Startwert der Messung auf eins gesetzt und alle Folgewerte auf diesen bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von mtDNA-Deletionen in Skelettmuskel, Leber und Herz von Wildtyp- und *taut*^{-/-} Mäusen

3.1.1 Etablierung einer Methode zum Nachweis von mtDNA-Deletionen mittels Real-time-PCR

In der mitochondrialen DNA (mtDNA) lassen sich verschiedene Deletionen nachweisen, deren Auftreten altersabhängig zunimmt. Die häufigste und bisher am besten beschriebene Deletion beim Menschen ist die so genannte *Common Deletion* (OZAWA *et al.*, 1999). Auch im mitochondrialen Genom (mtGenom) der Maus wurden verschiedene Deletionen nachgewiesen, von denen einige mit der *Common Deletion* vergleichbar sind (TANHÄUSER *et al.*, 1995). Das Auftreten von mtDNA-Deletionen wurde im Maussystem bisher nur über klassische PCR nachgewiesen (TANHÄUSER *et al.*, 1995; EIMON *et al.*, 1996). Um die relative Anzahl an deletierten mtDNAs nachzuweisen, wurde dieses System in der vorliegenden Arbeit auf die Real-time-PCR übertragen und optimiert (Abb. 3.1).

Zur Bestimmung der Gesamtzahl an Mitochondriengenomen wurde das Primerpaar PL48 (Tabelle 2.1) eingesetzt. Diese Primer amplifizieren ein 119 bp großes DNA-Fragment aus der 12S rRNA, einem Bereich nahe des Replikationsursprungs der leichten mtDNA-Kette, in dem es sehr selten zu Deletionen kommt (EIMON *et al.*, 1996). Die Primer D1, D3 und D13 amplifizieren 206 bp, 103 bp, bzw. 149 bp große Fragmente aus den mtDNA-Genomen mit einer entsprechenden Deletion. Die größeren Produkte aus der in diesen Bereichen nicht mutierten mtDNA (4073 bp, 3809 bp, bzw. 5123 bp) können wegen der stringenten PCR-Bedingungen nicht amplifiziert werden.

Drei mtDNA-Deletionen, die der humanen *Common Deletion* am ähnlichsten sind, wurden mittels spezifischer Primer in der Skelettmuskulatur aus Wildtyp-, *taut*^{+/-} und *taut*^{-/-} Mäusen nachgewiesen (D1, mtDNA^{3867bp}; D3, mtDNA^{7266bp}; D13, mtDNA^{4974 bp}, Abb. 3.2). Die Deletionen umfassen die Gene der Untereinheiten 3-5 der NADH-Dehydrogenase, sowie zusätzlich deren Untereinheit 6 in D13. Weiterhin sind in D1 und D13 das Gen für die Untereinheit 3 der Cytochrom c Oxidase betroffen. Die Analyse der amplifizierten Fragmente über Dissoziationskurven ergab, dass alle eingesetzten Primer für den Nachweis der Deletionen geeignet sind (Abb. 3.3).

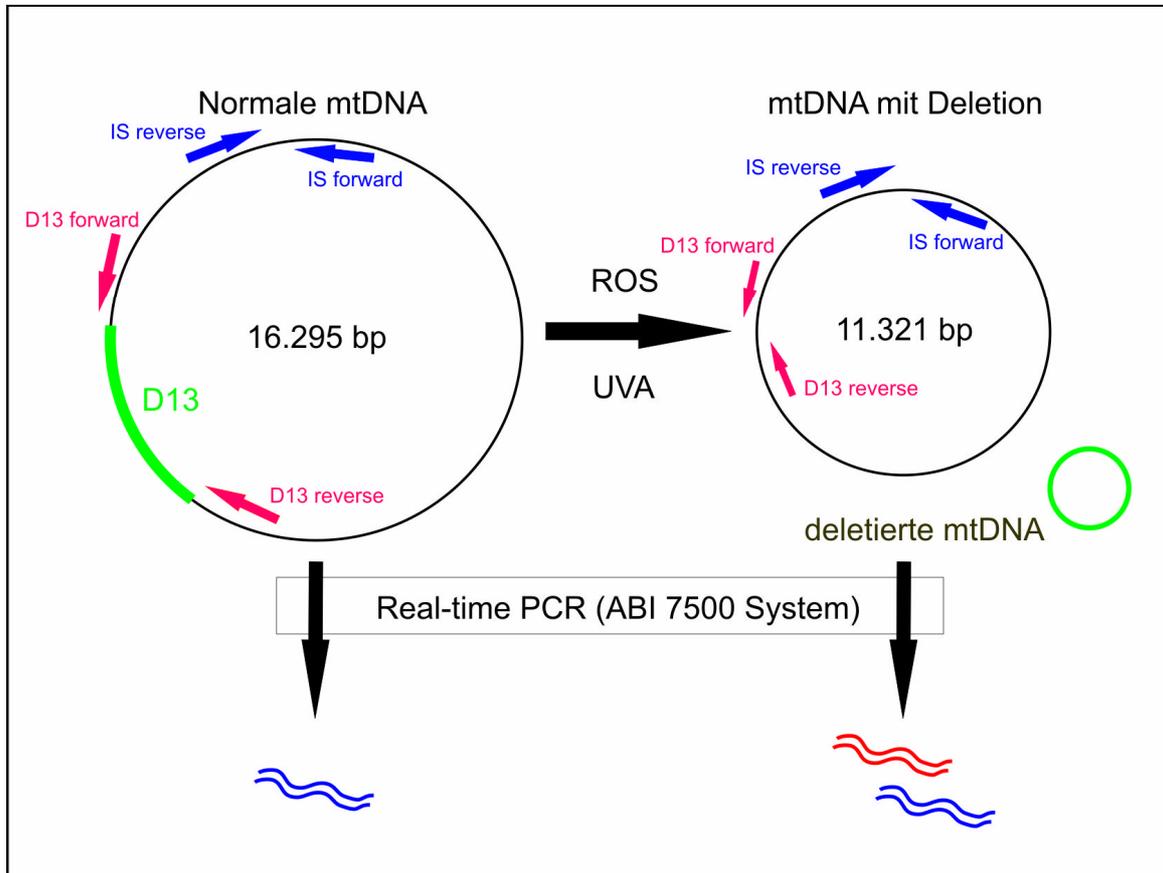


Abb. 3.1: schematische Darstellung der relativen Quantifizierung von mtDNA-Deletionen über Real-time-PCR

Zum Nachweis der Gesamtzahl an mtDNA-Molekülen wurde ein Fragment (interner Standard, IS=PL48) aus dem 12S rRNA Gen amplifiziert. Die Primer zum Nachweis der Deletionen wurden so gewählt, dass sie außerhalb der erwarteten Deletionen binden. Bei mtDNA-Molekülen ohne die jeweilige Deletion können diese Primer wegen der stringenten PCR-Bedingungen keine Amplifikate bilden. In diesen Molekülen wird deswegen nur das 119 bp große Standardfragment (blau) gebildet. In mtDNA-Molekülen z.B. mit der Deletion 13 wird zusätzlich ein 149 bp großes Fragment (rot) amplifiziert. Diese Fragmente wurden mit Hilfe von SYBRTM Green visualisiert und vom ABI 7500 Detektionssystem automatisch quantifiziert. Die Daten wurden als Anzahl an Genomen mit der jeweiligen Deletion pro Gesamtzahl an Genomen angegeben.

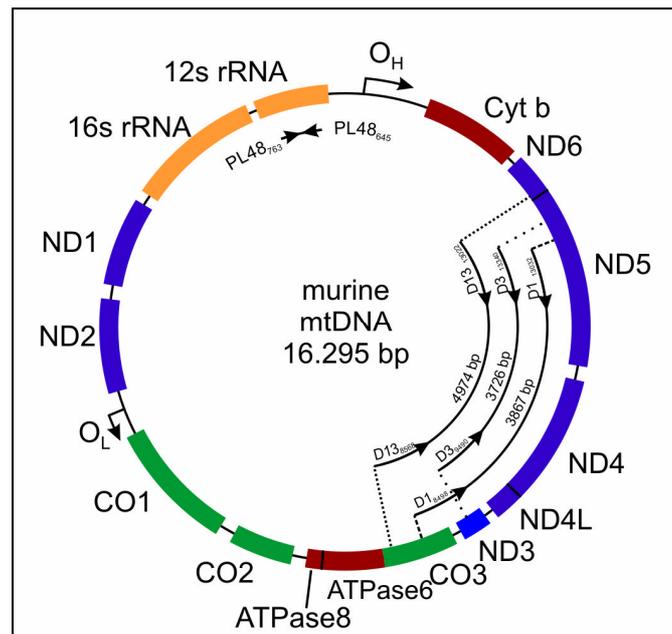


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des murinen mtGenoms mit den Positionen der drei nachgewiesenen mtDNA-Deletionen D1 (3867 bp), D3 (3726 bp) und D13 (4974 bp)

Die murine mtDNA besteht aus 16.295 Basenpaaren mit 37 Genen (13 essentielle Proteine der Atmungskette, 22 tRNAs und zwei rRNAs). Abkürzungen: Cyt b: Komplex III Cytochrom b-Gen; ND 1-6: Komplex I NADH-Dehydrogenase-Gene, Untereinheiten 1-6; CO1-3: Komplex IV Cytochrom c Oxidase-Gene, Untereinheiten 1-3; OH und OL: Replikationsstartpunkte der schweren und leichten Kette

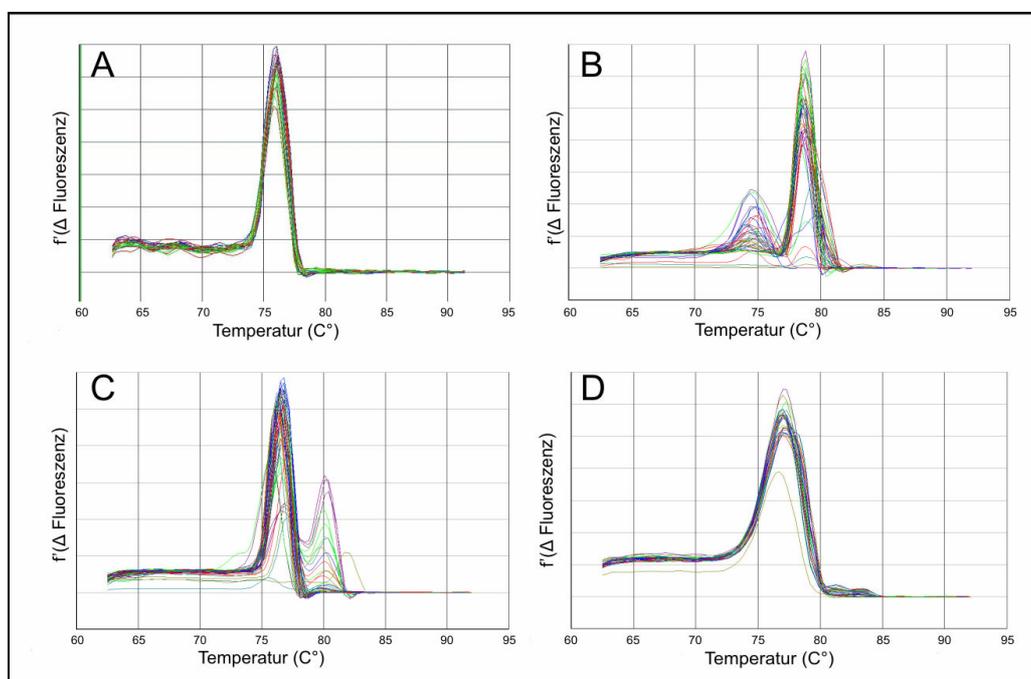


Abb. 3.3: Schmelzkurven der mit den Primerpaaren PL48 (A), D1 (B), D3 (C) und D13 (D) amplifizierten Fragmente. Im Anschluss an jede Real-time-PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt, um zu überprüfen, ob in der PCR ein einheitliches, der erwarteten Größe entsprechendes, Amplikon gebildet wurde.

3.1.2 Altersabhängiges Auftreten von mtDNA-Deletionen

Alle drei untersuchten mtDNA Deletionen wurden im Skelettmuskel sowohl 2 Monate als auch 15-16 Monate alter Wildtyp-, *taut*^{+/-} und *taut*^{-/-} Mäuse nachgewiesen (Abb. 3.4). In den jungen Tieren traten nur wenige Deletionen ($0,2-26 \times 10^{-8}$) auf. Mit zunehmendem Alter treten diese Deletionen verstärkt auf (Abb. 3.4).

D1 ließ sich fast 10-mal häufiger in 15-16 Monate alten Wildtyp- ($2,1 \times 10^{-6}$ mutierte Genome / Genome gesamt), *taut*^{+/-} ($3,1 \times 10^{-6}$) und *taut*^{-/-} ($2,2 \times 10^{-6}$) Mäusen nachweisen, als in den 2 Monate alten Tieren ($9,54 \times 10^{-8}$, $26,1 \times 10^{-8}$ und $23,1 \times 10^{-8}$ mutierte Genome / Genome gesamt).

D3 trat sowohl bei den 2 Monate alten Wildtyp ($4,54 \times 10^{-9}$), *taut*^{+/-} ($17,0 \times 10^{-9}$) und *taut*^{-/-} ($19,0 \times 10^{-9}$), als auch bei den älteren Tieren ($2,0 \times 10^{-8}$, $6,3 \times 10^{-8}$ und $3,7 \times 10^{-8}$) im Vergleich zu den anderen untersuchten Deletionen am seltensten auf.

D13 wurde in den älteren Tieren am häufigsten nachgewiesen, sie tritt über 40- bzw. 2000-mal häufiger auf als D1 und D3.

Die Menge an Genomen mit der Deletion 13 war über 3000-mal höher in den alten Wildtyp- ($9,7 \times 10^{-5}$ mutierte Genome / Genome gesamt), *taut*^{+/-} ($12,8 \times 10^{-5}$) und *taut*^{-/-} Tieren ($15,2 \times 10^{-5}$) im Vergleich zu den Jungtieren ($2,2 \times 10^{-8}$, $3,7 \times 10^{-8}$ und $2,3 \times 10^{-8}$ mutierte Genome / Genome gesamt).

3.1.3 mtDNA-Deletionen und Taurinmangel

Im Skelettmuskel 15-16 Monate alter *taut*^{-/-} Mäuse wurden 60 % mehr Genome mit der Deletion 13 detektiert als in Wildtypmäusen gleichen Alters (Abb. 3.4). Auch in heterozygoten Mäusen ist ein tendenziell verstärktes Auftreten von D13 zu beobachten.

In der Leber wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von D13-Deletionen von 15-16 Monate alten Wildtyp und *taut*^{-/-} Mäusen beobachtet (Abb. 3.5). Während D13 in den Lebern 2 Monate alter Wildtyp- ($71,1 \times 10^{-8}$ mutierte Genome / Genome gesamt) und *taut*^{-/-} Tiere ($176,3 \times 10^{-8}$) signifikant häufiger auftritt als im Skelettmuskel, ist dieser Unterschied bei den alten Tieren ($7,0 \times 10^{-5}$ und $7,4 \times 10^{-5}$) nicht mehr nachzuweisen.

Auch im Herzen von 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäusen ($5,7 \times 10^{-7}$) ist im Vergleich zum Wildtyp ($3,9 \times 10^{-7}$) kein signifikanter Unterschied bei der Häufigkeit von D13 zu beobachten (Abb. 3.6). Außerdem tritt die D13-Deletion im Herzen im Vergleich zu Muskel und Leber wesentlich seltener auf.

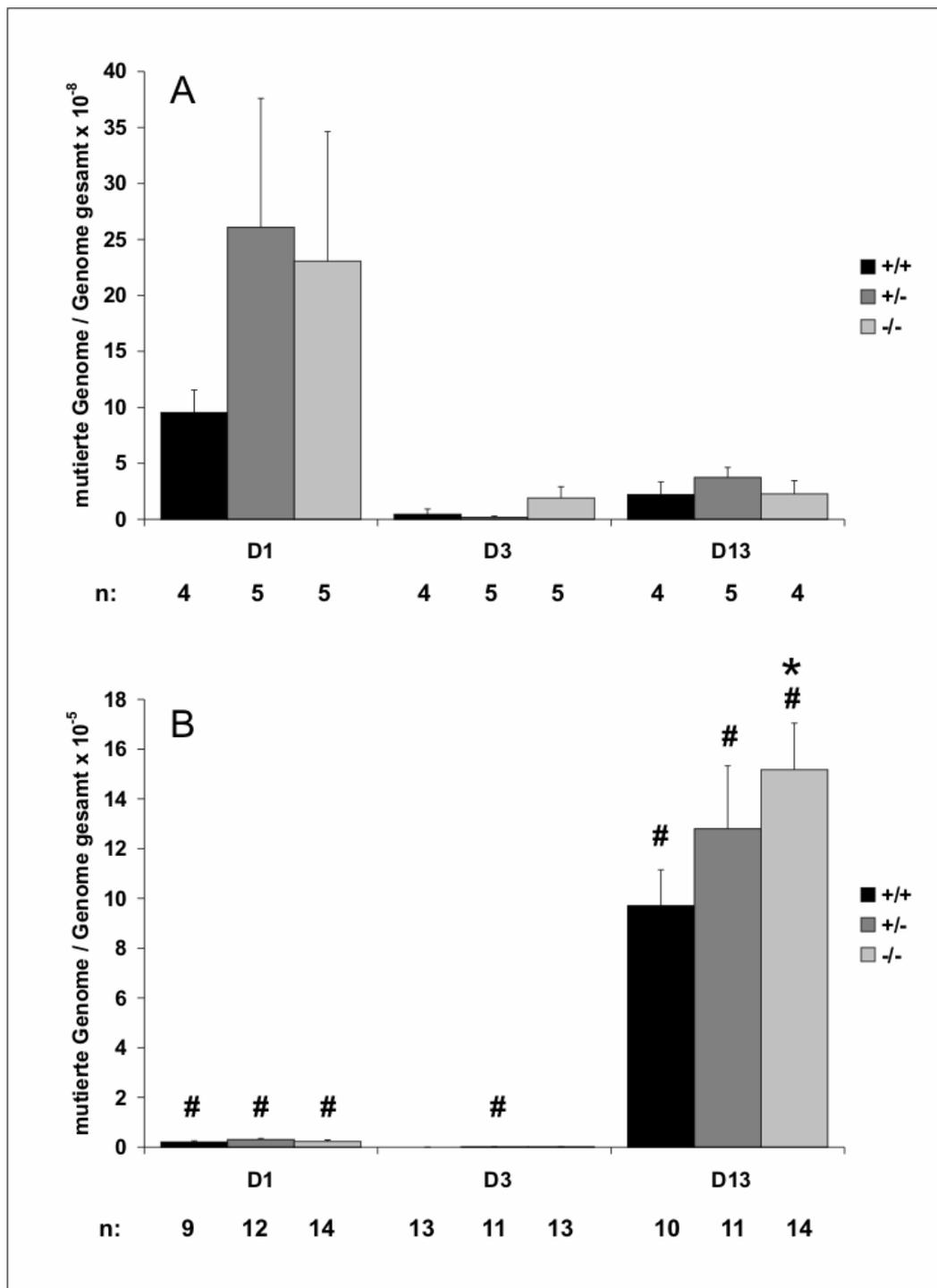


Abb. 3.4: Auftreten der drei untersuchten Deletionen im Skelettmuskel von 2 (A) und 15-16 Monate (B) alten Wildtyp, *taut*^{+/-} und *taut*^{+/+} Mäusen. DNA wurde aus den Oberschenkelmuskeln von 2 und 15-16 Monate alten Wildtyp-, *taut*^{+/-} und *taut*^{+/+} Mäusen isoliert und anschließend über Real-time-PCR, wie in Material und Methoden beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse wurden als Anzahl an mtGenomen mit der jeweiligen Deletion bezogen auf die Gesamtzahl an mtGenomen $\times 10^{-8}$ (A) bzw. $\times 10^{-5}$ (B) dargestellt.

* signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,05$).

signifikant unterschiedlich im Vergleich zu 2 Monate alten Tieren ($p < 0,05$)

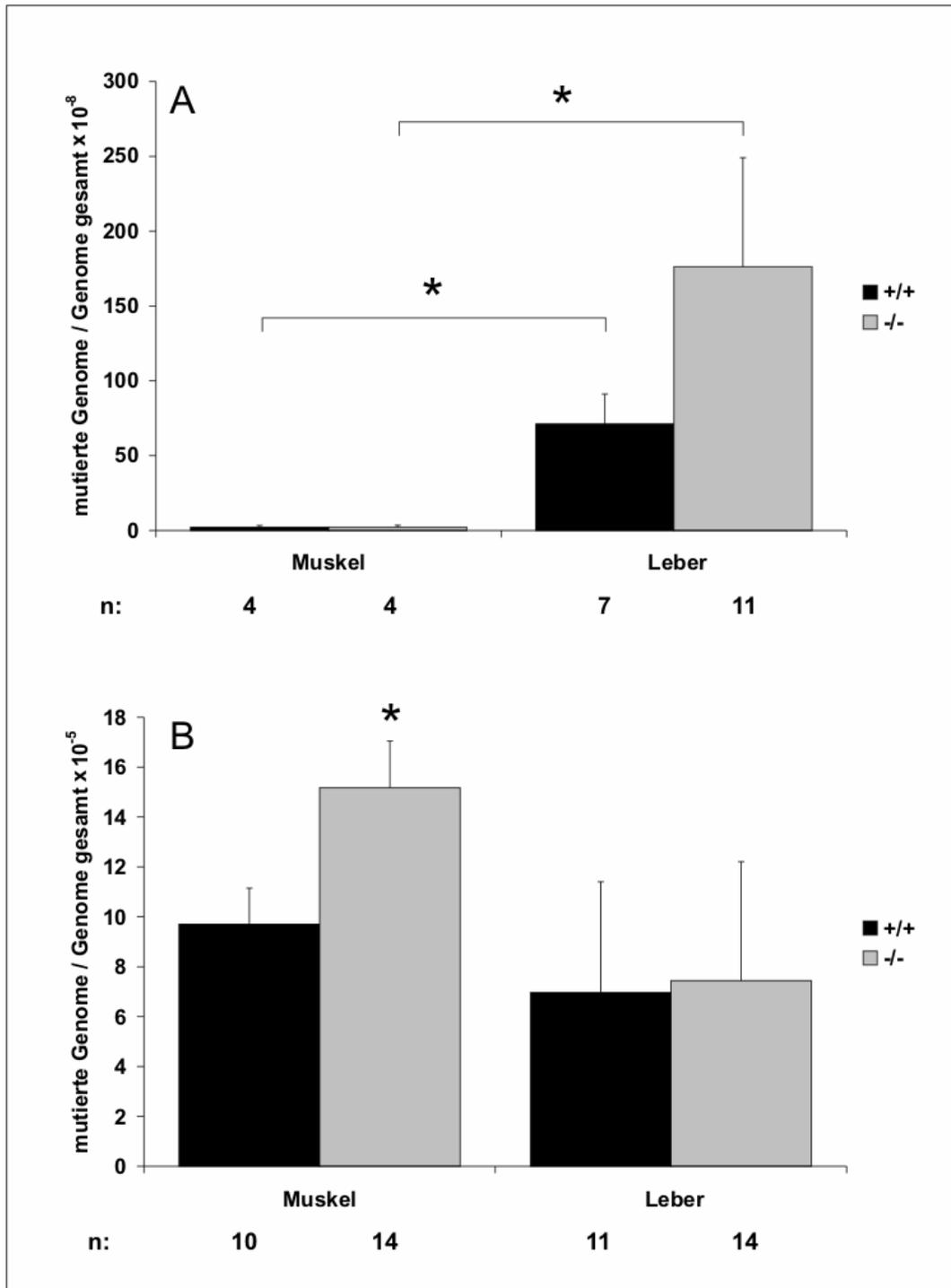


Abb. 3.5: Auftreten von D13 im Skelettmuskel und in der Leber von 2 (A) und 15-16 Monate (B) alten Wildtyp und *taut*^{-/-} Mäusen. DNA wurde aus den Oberschenkelmuskeln bzw. Lebern von 2 und 15-16 Monate alten Wildtyp, *taut*^{+/-} und *taut*^{-/-} Mäusen isoliert und anschließend über Real-time-PCR, wie in Material und Methoden beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse wurden als Anzahl an mtGenomen mit der jeweiligen Deletion bezogen auf die Gesamtzahl an mtGenomen × 10⁻⁸ (A) bzw. × 10⁻⁵ (B) dargestellt.

* signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Skelettmuskel (A) bzw. zum Wildtyp (B) (p<0,05)

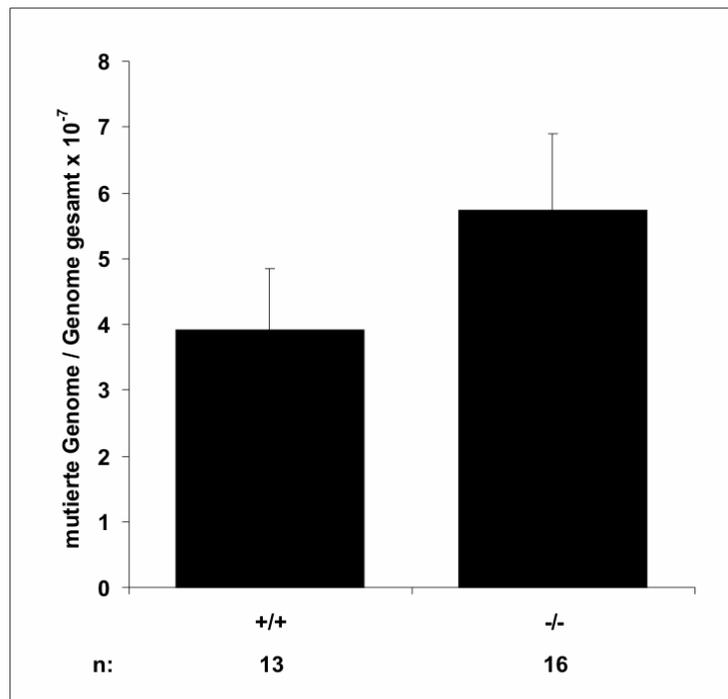


Abb. 3.6: Auftreten von D13 im Herzen von 15-16 Monate alten Wildtyp (+/+) und *taut*^{-/-} Mäusen. DNA wurde aus Herzen von 15-16 Monate alten Wildtyp- und *taut*^{-/-} Mäusen isoliert und anschließend über Real-time-PCR, wie in Material und Methoden beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse wurden als Anzahl an mtGenomen mit D13 bezogen auf die Gesamtzahl an mtGenomen $\times 10^{-7}$ dargestellt.

3.2 Analyse von Risikofaktoren im Herzen von Wildtyp- und *taut*^{-/-}-Mäusen mittels DNA-Mikroarrays, Real-time-PCR und Western Blot

Die Beobachtung, dass die Deletion D13 im Herzen viel seltener auftritt als im Skelettmuskel und dass es zusätzlich im Skelettmuskel zu einer verstärkten Ausbildung dieser Deletion in *taut*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren kommt korreliert mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Untersuchungen, dass es in *taut*^{-/-}-Tieren zu einer Schädigung des Muskels kommt, während die Grundfunktion des Herzens erhalten bleibt (WARSKULAT *et al.*, 2004).

Um Unterschiede der Genexpression im Herzen von *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-}-Mäusen zu ermitteln, wurde ein Mikroarray eingesetzt, auf dem sich Sonden für 251 herzrelevante Gene befinden. Reproduzierbare und signifikante Hybridisierungssignale wurden für 163 Gene nachgewiesen. 11 dieser Gene zeigten eine über 25 %ige Erhöhung bzw. Erniedrigung der mRNA-Spiegel in 2 Monate und/oder 15-16 Monate alten *taut*^{-/-}-Tieren (Tabelle 3.1). Die kompletten Daten der Mikroarray-Analyse ist bei *Gene Expression Omnibus* (GEO) unter GSE4814 zu finden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

Die mRNA-Spiegel von ANF (*atrial natriuretic factor*), BNP (*brain natriuretic peptide*), CARP (*cardiac ankyrin repeat protein*) und die Prokollagene 1a1, 1a2 und 3a1 sind im Herzen von *taut*^{-/-}-Tieren erhöht (Tabelle 3.1). Alle Faktoren sind etablierte Biomarker für Hypertonie und kardiale Hypertrophien (BISHOP *et al.*, 1994; AIHARA *et al.*, 2000; LOPEZ *et al.*, 2001; WOODS, 2004; CHEN, 2005). In den Herzen der *taut*^{-/-}-Tiere kommt es zu einem 4- bzw. 9-fachem Anstieg der ANF- und einem 1,5 bzw. 2-fachem Anstieg der BNP-Expression. Der Unterschied dieser mRNA-Spiegel zwischen den beiden Genotypen ist bei den jungen Tieren signifikant stärker ausgeprägt als bei den 15-16 Monate alten Tieren (Tabelle 3.2). Während die mRNA-Spiegel von ANF in der *taut*^{-/-}-Maus im Alter nicht weiter anstiegen, ist beim Wildtyp eine Steigerung um das Doppelte zu beobachten (Tabelle 3.1).

Die mRNA-Spiegel von CARP zeigen im Vergleich zum Wildtyp einen Anstieg um 100 % im Herzen von 2 Monate alten *taut*^{-/-}-Tieren, 15-16 Monate alte Tiere zeigen nur einen Anstieg um ~40 %.

Tabelle 3.1: DNA-Mikroarray-Analyse von Wildtyp und *taut*^{-/-} Herzen: Ein mausspezifischer DNA-Oligonukleotid-Microarray wurde zur Analyse der Genexpression in Herzen von 2 und 15-16 Monate alten Wildtyp und *taut*^{-/-} Mäusen eingesetzt.

mRNA-Spiegel (Arbiträre Einheit) wurden auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- (GAPDH) Expression normiert (siehe Kapitel 2.7.2)

* signifikant verschieden vom Wildtyp, n=4-5 (p<0,05) (modifiziert nach WARSKULAT *et al.*, 2006a)

| Gen | 2 Monate alte Tiere | | |
|----------------|---|--|---|
| | mRNA-Expression Wildtyp [#] (AE) | mRNA-Expression <i>taut</i> ^{-/-} [#] (AE) | Veränderung mRNA-Expression <i>taut</i> ^{-/-} gegenüber <i>taut</i> ^{+/+} (%) |
| ANF | 2034 ± 553 | 19288 ± 4603 * | + 848 |
| BNP | 1441 ± 363 | 2741 ± 452 * | + 90 |
| CARP | 2634 ± 206 | 5747 ± 1554 * | + 118 |
| Acta1 | 4831 ± 577 | 1102 ± 167 * | - 77 |
| Actb | 1828 ± 252 | 2498 ± 492 * | + 37 |
| Actg | 6625 ± 1304 | 8434 ± 1586 | + 27 |
| Col 1a1 | 809 ± 250 | 1146 ± 312 * | + 42 |
| Col 1a2 | 407 ± 74 | 578 ± 98 * | + 42 |
| Col 3a1 | 625 ± 74 | 1123 ± 239 * | + 80 |
| Slc38a2 (ATA2) | 228 ± 21 | 380 ± 62 * | + 67 |
| Slc38a3 (NAT1) | 221 ± 15 | 155 ± 11 * | - 30 |
| GAPDH | 9817 ± 2729 | 8601 ± 854 | - 12 |

| Gen | 15-16 Monate alte Tiere | | |
|----------------|---|--|---|
| | mRNA-Expression Wildtyp [#] (AE) | mRNA-Expression <i>taut</i> ^{-/-} [#] (AE) | Veränderung mRNA-Expression <i>taut</i> ^{-/-} gegenüber <i>taut</i> ^{+/+} (%) |
| ANF | 5708 ± 1838 | 24251 ± 2361 * | + 325 |
| BNP | 2407 ± 522 | 3512 ± 379 * | + 46 |
| CARP | 5015 ± 1030 | 6865 ± 402 * | + 37 |
| Acta1 | 4446 ± 1291 | 1168 ± 581 * | - 74 |
| Actb | 2226 ± 474 | 2509 ± 266 | + 13 |
| Actg | 7907 ± 1463 | 8512 ± 875 | + 8 |
| Col 1a1 | 471 ± 64 | 461 ± 72 | - 2 |
| Col 1a2 | 364 ± 70 | 400 ± 27 | + 10 |
| Col 3a1 | 540 ± 136 | 565 ± 74 | + 5 |
| Slc38a2 (ATA2) | 202 ± 38 | 326 ± 54 * | + 61 |
| Slc38a3 (NAT1) | 237 ± 41 | 159 ± 17 * | - 33 |
| GAPDH | 9495 ± 2036 | 9086 ± 865 | - 4 |

Tabelle 3.2: mRNA-Spiegel im Herzen von 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäusen verglichen mit 2 Monate alten Tieren. Die mRNA-Spiegel der 2 Monate alten Tiere wurden auf 100 % gesetzt und die mRNA-Spiegel der älteren Tiere darauf bezogen.

* signifikant verschieden zu den 2 Monate alten Tieren, n=4-5 (p<0,05). (modifiziert nach WARSKULAT *et al.*, 2006a)

| | Wildtyp | <i>taut</i> ^{-/-} |
|----------------|--|----------------------------|
| Gen | Genexpression in Herzen 15-16 Monate alter Tiere im Vergleich zu 2 Monate alten Tieren (%) | |
| ANF | 281 * | 126 |
| BNP | 167 * | 128 |
| CARP | 190 * | 119 |
| Acta1 | 92 | 106 |
| Actb | 122 | 100 |
| Actg | 119 | 101 |
| Col 1a1 | 58 | 40 * |
| Col 1a2 | 89 | 69 * |
| Col 3a1 | 86 | 50 * |
| Slc38a2 (ATA2) | 89 * | 86 * |
| Slc38a3 (NAT1) | 107 | 103 |
| GAPDH | 97 | 105 |

Tabelle 3.3: Bestimmung der mRNA-Spiegel von Aktin-Isomeren und ANF im Herzen von 2 Monate alten *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Mäusen mittels Real-time-PCR. Für die Standardisierung der relativen mRNA-Spiegel wurde die endogene Kontrolle Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) verwendet.

* signifikant unterschiedlich zum Wildtypen, n=5 (p<0,05). (modifiziert nach WARSKULAT *et al.*, 2006a)

| Gen | mRNA-Spiegel Wildtyp (Kopien/HPRT Kopie) | mRNA-Spiegel <i>taut</i> ^{-/-} (Kopien/HPRT Kopie) | Veränderung mRNA-Spiegel im <i>taut</i> ^{-/-} gegenüber <i>taut</i> ^{+/+} (%) |
|--|--|---|---|
| <i>Skeletal actin alpha 1 (Acta1)</i> | 23,36 ± 3,04 | 1,56 ± 6,32 * | - 73 |
| <i>Smooth muscle actin alpha 2 (Acta2)</i> | 4,90 ± 0,57 | 21,06 ± 2,22 * | + 330 |
| <i>Cytoplasmatic actin gamma 1 (Actg1)</i> | 4,20 ± 0,60 | 4,16 ± 0,40 | - 1 |
| <i>Smooth muscle actin gamma 2 (Actg2)</i> | 0,17 ± 0,02 | 0,31 ± 0,12 | + 82 |
| <i>Cardiac actin alpha (Actc1)</i> | 48,34 ± 9,07 | 68,42 ± 25,48 | + 42 |
| Artrieller natriuretischer Faktor (ANF) | 4,85 ± 1,25 | 26,05 ± 1,38 * | + 437 |

Die Prokollagene 1a1, 1a2 und 3a1 waren im *taut*^{-/-} Tier ebenfalls hochreguliert. Wie bei den vorher erwähnten Genen ist auch hier der Unterschied in jungen Tieren stärker ausgeprägt als in älteren Tieren.

Die DNA-Mikroarray-Analyse ergab, dass Acta1 (*skeletal muscle alpha-actin*) mRNA-Spiegel im Herzen sowohl bei jungen als auch bei alten *taut*^{-/-} Mäusen um über 70 % herabreguliert waren (Tabelle 3.1). Im Gegensatz zu Acta1 waren die mRNA-Spiegel von β - und γ -Aktin nur leicht erhöht. Altersabhängig kommt es weder beim Wildtyp noch beim *taut*^{-/-} zu einer Änderung der mRNA-Expressionsspiegel.

Real-time-PCR-Analysen haben übereinstimmend mit der DNA-Mikroarray-Analyse gezeigt, dass es in *taut*^{-/-} Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren zu einer Herabregulation von Acta1 um über 70 % kommt (Tabelle 3.3). Auch auf Proteinebene wurde mittels einer Western Blot-Analyse eine starke Erhöhung von Acta2 im Herzen von *taut*^{-/-} Mäusen beobachtet (Abb. 3.7).

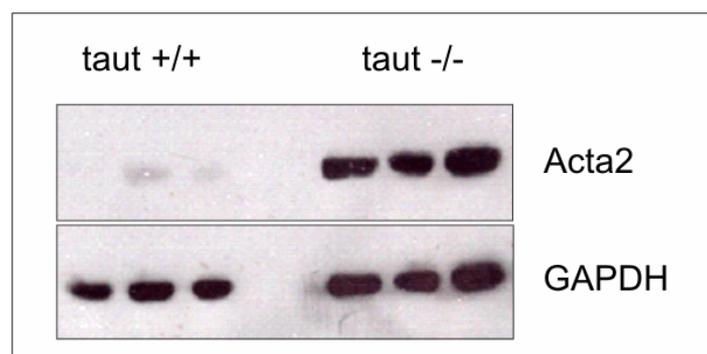


Abb. 3.7: Western Blot-Analyse der Acta2 und GAPDH Expression im Herzen von Wildtyp- und *taut*^{-/-} Mäusen. Die Expression von Acta2 im Herzen von 15-16 Monate alten Wildtyp (*taut*^{+/+}) und *taut*^{-/-} Tieren wurde über Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers analysiert. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Expressionskontrolle.

3.3 Untersuchungen an isolierten Mitochondrien aus Leber und Skelettmuskel von Wildtyp und *taut*^{-/-} Mäusen

3.3.1 Aktivitätsassays

3.3.1.1 JC-1-Assay

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 lässt sich das Membranpotential von Mitochondrien bestimmen (REERS *et al.*, 1991). In funktionellen Mitochondrien wird der Farbstoff in die Matrix transportiert, wo er stark fluoreszierende Agglomerate bildet. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Fluoreszenz von grün (JC-1 Monomere außerhalb des Mitochondriums) zu rot. Ist das Membranpotential gestört, so wird der Farbstoff nicht aufgenommen und kann nicht akkumulieren, die Fluoreszenz bleibt grün. Diese Fluoreszenzverschiebung lässt sich als Anstieg der JC-1-Fluoreszenz bei 590 nm darstellen.

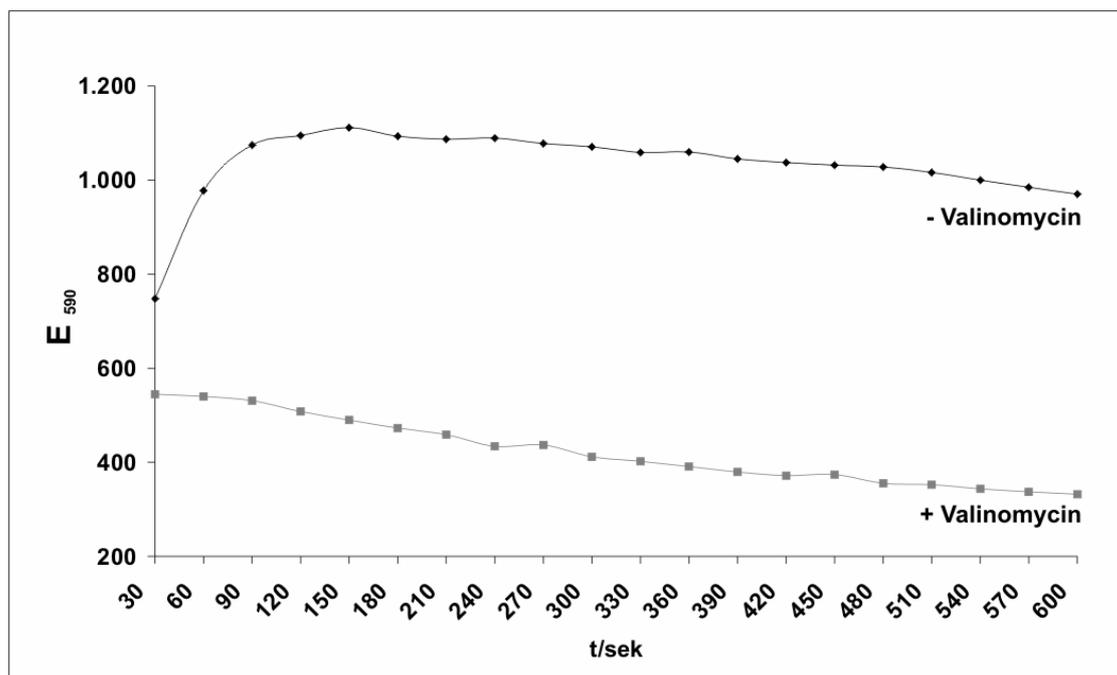


Abb. 3.8: JC-1 Fluoreszenz in isolierten Lebermitochondrien. Das Membranpotential von isolierten Mitochondrien aus Lebern von 15-16 Monate alten *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Tieren wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 im Fluorimeter gemessen. Als Kontrolle wurde das Ionophor Valinomycin (500 nM) zugegeben, durch das die Mitochondrienmembran zerstört wird. Die Abbildung zeigt eine Messung in Lebermitochondrien aus einer *taut*^{+/+} Maus. Sie ist repräsentativ für n=4 Wildtyp- bzw. *taut*^{-/-} Tiere. Die Messung der *taut*^{-/-} Mitochondrien zeigte keinen Unterschied zu den *taut*^{+/+} Mitochondrien.

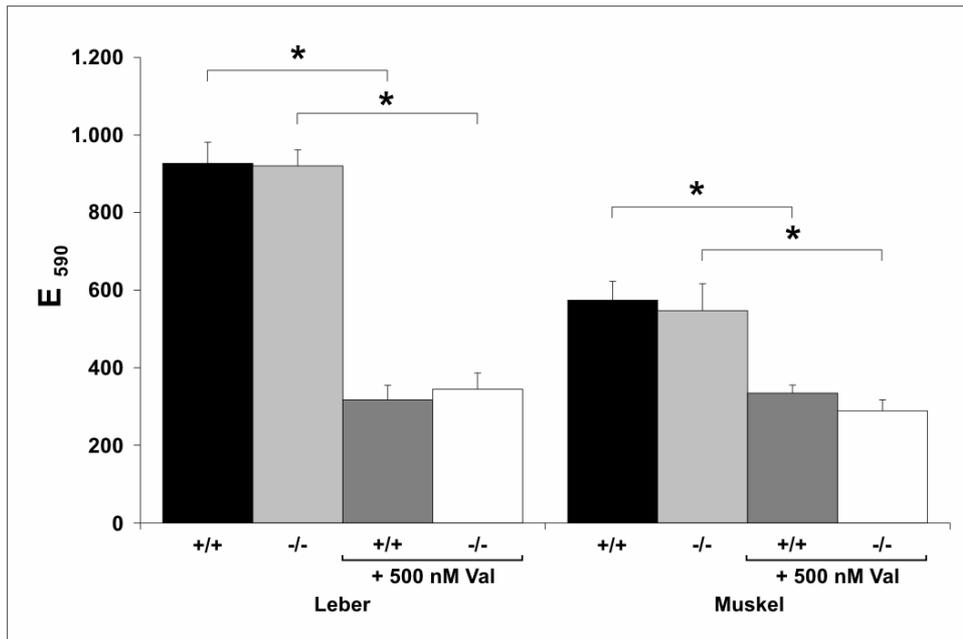


Abb. 3.9: JC-1 Fluoreszenz in isolierten Leber- und Skelettmuskelmitochondrien von *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Mäusen. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 wurde das Membranpotential von isolierten Leber- und Skelettmuskelmitochondrien aus 15-16 Monate alten Wildtyp- (*+/+*) und *taut*^{-/-} Tieren gemessen. Als Kontrolle wurde das Ionophor Valinomycin (Val) zugegeben. Die statistische Auswertung erfolgte für den Zeitpunkt 180 sek nach Start der Messung (siehe Abb. 3.8).

*signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit Valinomycin, n=4 (p<0,05)

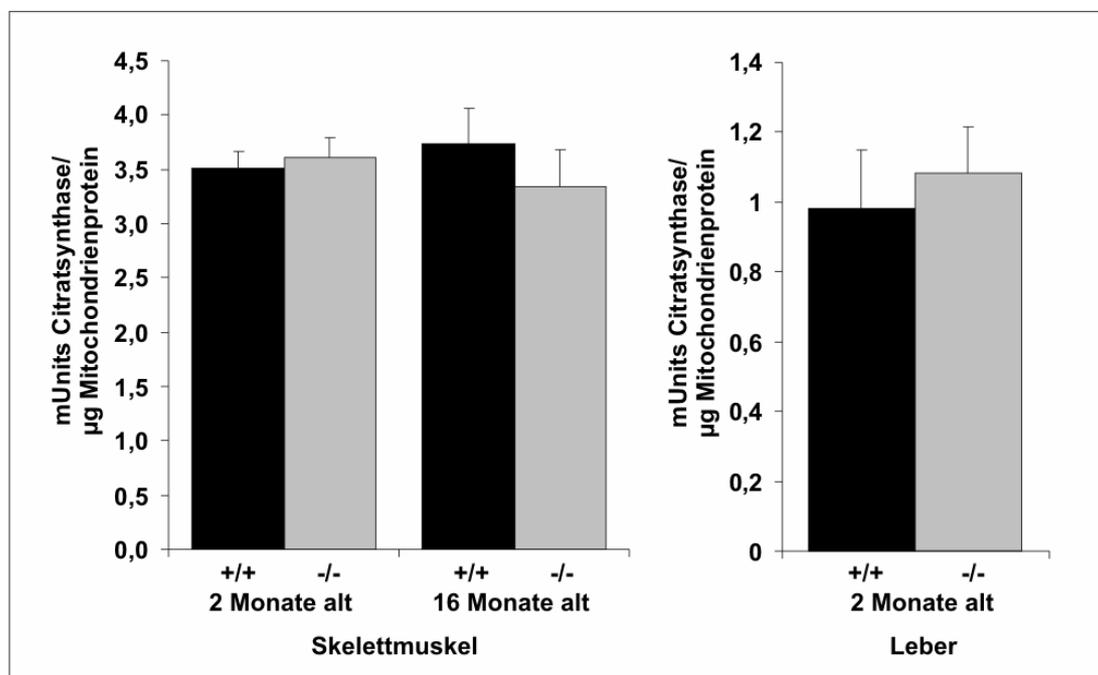


Abb. 3.10: Aktivität der Citratsynthase in isolierten Skelettmuskel- und Lebermitochondrien. Über einen Citratsynthase-Assay wurde die Aktivität des Enzyms in isolierten Skelettmuskelmitochondrien von 2 und 16 Monate alten, bzw. in Lebermitochondrien von 2 Monate alten Wildtyp- (*+/+*) und *taut*^{-/-} Tieren, wie in Material und Methoden beschrieben, gemessen. Je n=5 (2 Monate alte Tiere) bzw. n=7 (16 Monate alte Tiere).

Um zu kontrollieren, ob die isolierten Mitochondrien intakt sind, wurde ihr Membranpotential gemessen. Außerdem sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Höhe des Membranpotentials zwischen Mitochondrien von *taut+/+* und *taut/-*-Mäusen sowohl im Skelettmuskel als auch in der Leber gibt.

Sowohl bei den isolierten Leber- (Abb. 3.8) als auch bei den Skelettmuskelmitochondrien wurde der Farbstoff bei allen untersuchten Proben in die Mitochondrien transportiert, was durch einen Anstieg der JC-1-Fluoreszenz bei 590 nm nachgewiesen wurde. Nach Zugabe von 500 nM Valinomycin wurde dagegen kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Valinomycin ist ein Ionophor und führt dazu, dass die Mitochondrienmembran durchlässiger wird und ein Membranpotential nicht mehr aufgebaut werden kann.

Ein Unterschied im Membranpotential von Mitochondrien aus der Skelettmuskulatur und der Leber von 15-16 Monate alten *taut+/+* und *taut/-*-Mäusen wurde mittels dieser Messmethode nicht beobachtet (Abb. 3.9).

3.3.1.2 Citratsynthase-Assay

Citratsynthase ist ein katalytisch wirkendes Enzym aus dem Citratzyklus. Sie ist in der Mitochondrienmatrix lokalisiert und wird als quantitativer Marker für den Gehalt an intakten Mitochondrien genutzt (HOLLOSZY *et al.*, 1970; WILLIAMS *et al.*, 1986; HOOD *et al.*, 1989).

Die gemessene Citratsynthase-Aktivität in den isolierten Mitochondrien der untersuchten Mäuse liegt im zu erwartenden Bereich (Kuznetsov *et al.*, 2005). Zwischen Wildtyp und *taut/-*-Mäusen ist weder in der Skelettmuskulatur noch in der Leber ein Unterschied in der Aktivität der Citratsynthase zu beobachten (Abb. 3.10).

Im Skelettmuskel wurde zusätzlich eine altersabhängige Bestimmung der Citratsynthase durchgeführt. Im Vergleich von 2 und 16 Monate alten Tieren kommt es zu keiner Änderung der Citratsynthaseaktivität.

3.3.1.3 Cytochrom c Oxidase-Assay

Mit Hilfe des Cytochrom c Oxidase-Assay Kits wurde die Aktivität der Cytochrom c Oxidase (COX) in isolierten Skelettmuskelmitochondrien aus 15-16 Monate alten *taut+/+* und *taut/-*-Mäusen bestimmt. Das Kit nutzt einen kolorimetrischen Assay. Dabei wird die Abnahme der Absorption bei 550 nm gemessen. Die kommt dadurch zustande, dass COX das Ferrocycytochrom c zu Ferricytochrom c oxidiert.

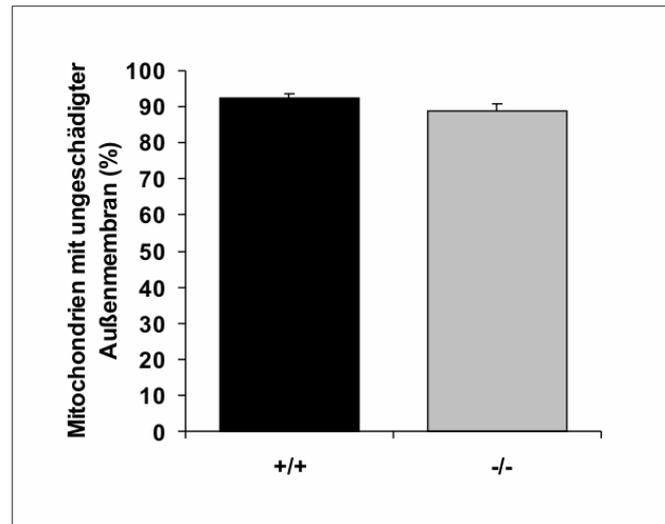


Abb. 3.11: Messung der mitochondrialen Membranintegrität in isolierten Skelettmuskelmitochondrien von 16 Monate alten *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Mäusen. Durch den Vergleich der Cytochrom c Oxidase-Aktivität von intakten und aufgeschlossenen Mitochondrien wurde die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran mittels eines Cytochrom c Oxidase-Assays bestimmt. Je n=8.

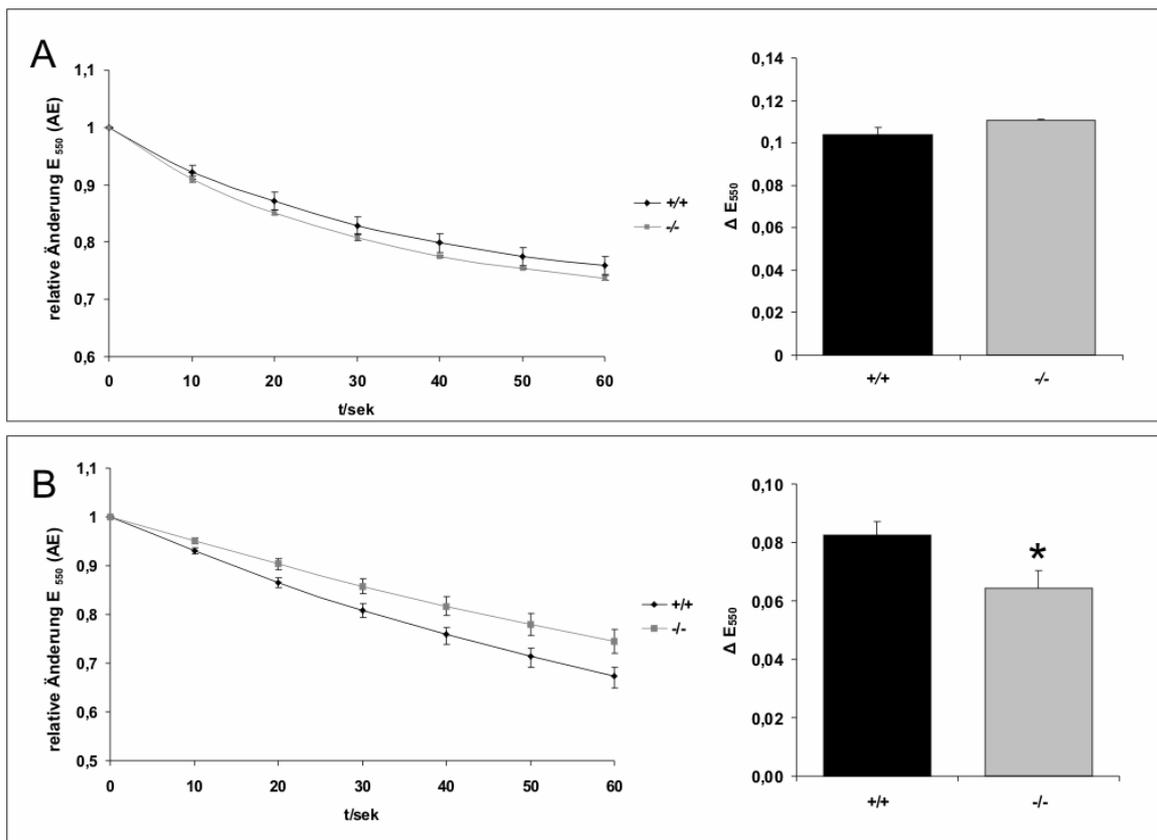


Abb. 3.12: Messung der COX-Aktivität in Mitochondrien aus 15-16 Monate alten Wildtyp- und *taut*^{-/-} Tieren. Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase in isolierten Mitochondrien aus Skelettmuskel (A) und Leber (B) wurde mit Hilfe eines COX-Assays über die Änderung der Absorption bei 550 nm gemessen. Die statistische Auswertung der Absorptionsabnahme (jeweils rechte Abbildung) erfolgte für den Endpunkt der Messung (nach 60 sek).

* signifikant unterschiedlich zum Wildtyp, je n=8 ($p < 0,05$)

Das Kit bietet zusätzlich die Möglichkeit, die Vitalität der isolierten Mitochondrien zu bestimmen. Dies erfolgt durch die Messung der COX-Aktivität in An- und Abwesenheit des Detergenz n-Dodecyl- β -D-Maltosid. Das Verhältnis der COX-Aktivität mit und ohne Detergenz ist ein Maß der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran, da die Membran eine natürliche Barriere für das Eintreten von Cytochrom *c* in das Mitochondrium ist (WOJTCZAK *et al.*, 1972). Die Bestimmung der Membranintegrität zeigte, dass ~90 % der isolierten Mitochondrien aus dem Skelettmuskel von 15-16 Monate alten Tieren eine intakte Außenmembran aufweisen. Ein Unterschied zwischen *taut+/+* und *taut-/-* Tieren wurde dabei nicht beobachtet (Abb. 3.11).

Die Messung der Aktivität der COX in isolierten Skelettmuskelmitochondrien von 15-16 Monate alten Tieren zeigte keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und *taut-/-* Tieren. In den isolierten Lebermitochondrien von 15-16 Monate alten *taut-/-* Mäusen wurde jedoch ein um ~20 % verringerte Aktivität der COX im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Abb. 3.12).

3.3.2 Western Blot-Analysen von mitochondrialen Proteinen

3.3.2.1 Nachweis von Atmungskettenkomplexen

Die Mitochondrien aus Lebern von über 15 Monate alten *taut-/-* -Mäusen zeigen sowohl morphologische als auch physiologische Veränderungen (WARSKULAT *et al.*, 2006). Um Hinweise darauf zu bekommen, inwiefern Taurinmangel einen schädlichen Einfluss auf das Mitochondrium hat, wurden Expressionsanalysen verschiedener mitochondrialer Proteine durchgeführt.

Im Skelettmuskel von 15-16 Monate alten *taut-/-* Tieren ließ sich eine erniedrigte Expression von Komplex I nachweisen, während Komplex IV hochreguliert ist (Abb. 3.13). In der Leber zeigt sich ein anderes Bild. Hier gibt es zwischen *taut+/+* und *taut-/-* Tieren keinen Unterschied in der Expression von Komplex I. Stattdessen sind sowohl die Cytochrom *c* Oxidase als auch Cytochrom *c* in der Leber der *taut-/-* Tieren deutlich herabreguliert.

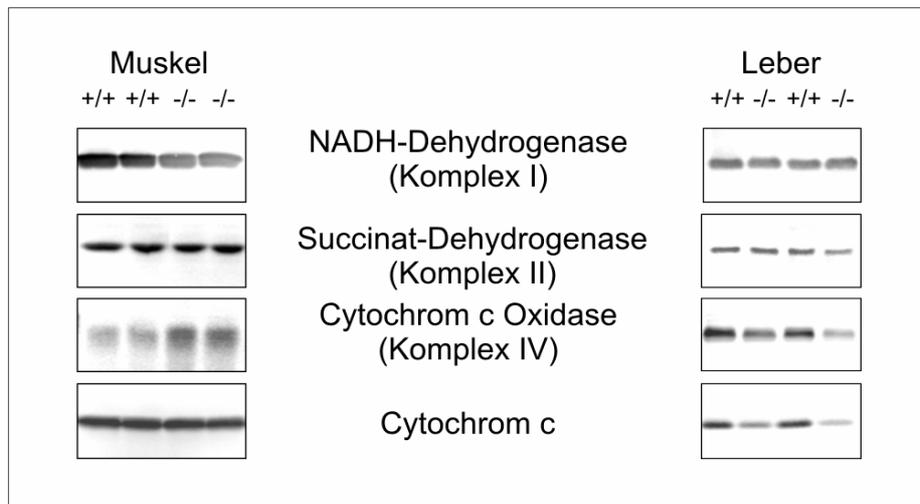


Abb. 3.13: Expressionsmuster verschiedener Atmungskettenkomplex-Untereinheiten. Expressionsspiegel verschiedener Untereinheiten (siehe Kapitel 2.3.1) der Atmungskettenkomplexe I, II und IV sowie Cytochrom c in isolierten Mitochondrien aus Skelettmuskel und Leber von 15-16 Monate alten Wildtyp- (+/+) und *taut*^{-/-} Tieren wurden über Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert. Die abgebildeten Western Blots sind repräsentativ für je n=4 Tiere.

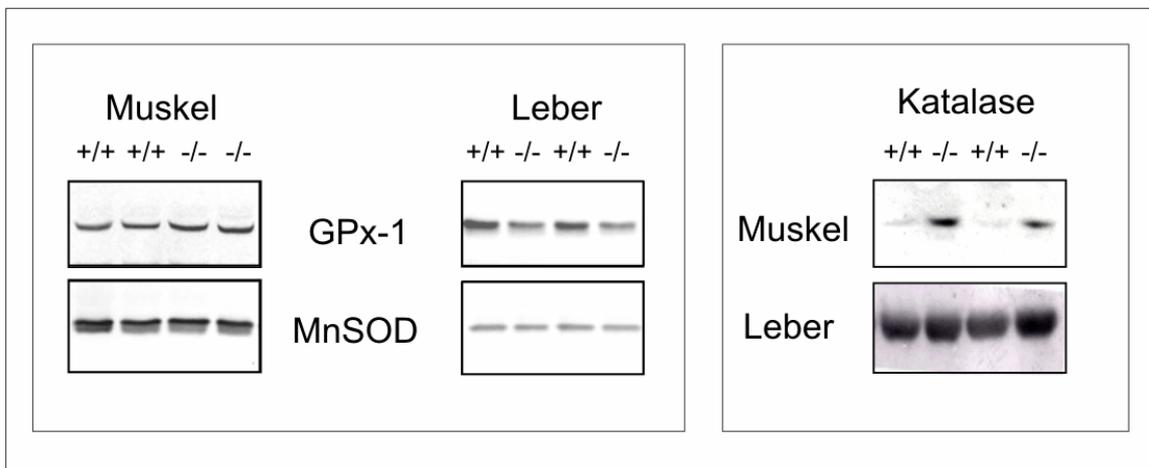


Abb. 3.14: Expressionsmuster verschiedener antioxidativer Enzyme. Glutathionperoxidase 1- (GPx-1), Mangan-Superoxiddismutase- (MnSOD) und Katalase- Expressionsspiegel in isolierten Mitochondrien aus Skelettmuskel und Leber von 15-16 Monate alten Wildtyp- (+/+) und *taut*^{-/-} Tieren wurden über Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert. Die abgebildeten Western Blots sind repräsentativ für je n=4 Tiere.

Weiterhin wurden antioxidativ wirkende Enzyme im Western Blot untersucht (Abb. 3.14). Dabei wurde in der Leber der 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäuse ein leichter Rückgang der Expression von Glutathionperoxidase (GPx-1) beobachtet. Im Skelettmuskel ist dies nicht der Fall. Die mitochondriale Superoxiddismutase (MnSOD) wird in beiden Fällen auf Proteinebene nicht unterschiedlich exprimiert, ganz im Gegensatz zur Katalase. Diese wird in beiden Geweben der *taut*^{-/-} Tiere stärker exprimiert, besonders deutlich ist dies im Skelettmuskelgewebe.

3.3.2.2 Nachweis nitrierter Proteine

Neben der Expressionsmuster verschiedener mitochondrialer Proteine wurde auch der Grad der Protein-Tyrosin-Nitrierung untersucht. Dies wurde ebenfalls über Western Blot-Analyse mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch an nitrierte Tyrosinreste bindet, durchgeführt.

Bei den 2 Monate alten Tieren wurde weder in Skelettmuskel- noch in Lebermitochondrien ein Unterschied im Grad der Tyrosinnitrierung beobachtet. In den Mitochondrien der 16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäuse aus Leber, Skelettmuskel und Herz ist dagegen ein vermehrtes Auftreten von nitrierten Proteinen im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abb. 3.15).

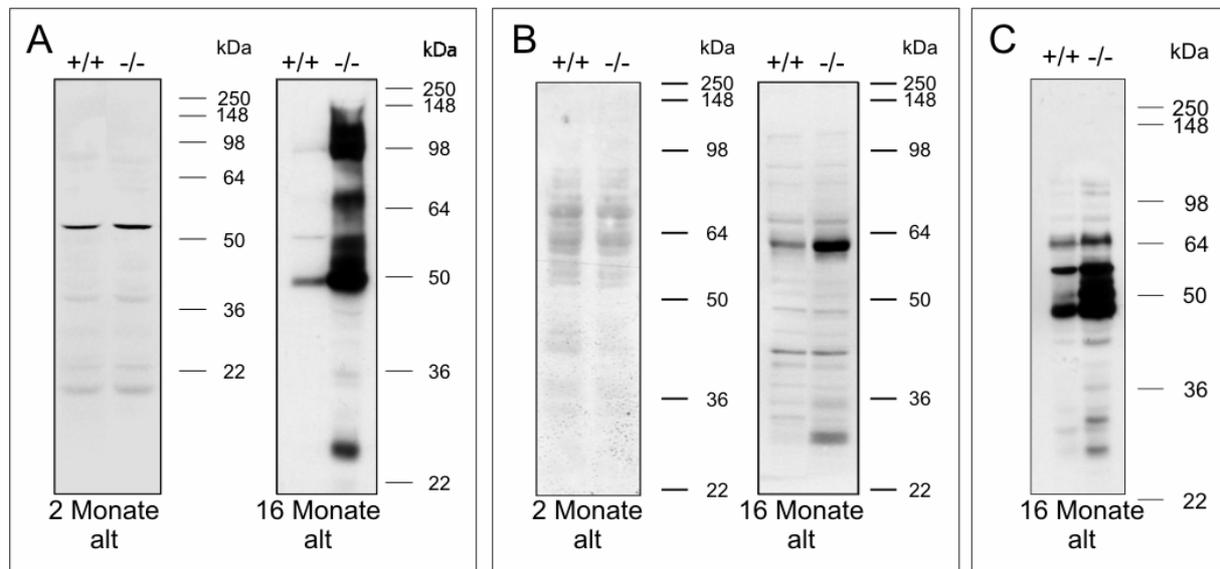


Abb. 3.15: Verstärkte Protein-Tyrosin-Nitrierung in *taut*^{-/-} Tieren. Nitrierte mitochondriale Proteine aus Skelettmuskel (A), Leber (B) und Herz (C) von Wildtyp- (+/+) und *taut*^{-/-} Tieren wurden im Western Blot mit einem NO₂Tyr Antikörper nachgewiesen. Die abgebildeten Western Blots sind repräsentativ für je n=4 Tiere.

3.3.3 Identifizierung nitrierter Proteine

Zur Identifizierung einzelner, in der Leber von 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Tieren verstärkt nitrierter Proteine wurde eine Immunpräzipitation mit anschließender Detektion von nitrierten Proteinen über Western Blot-Analyse durchgeführt.

Die Immunpräzipitation erfolgte mit Hilfe des *Complex I Immunocapture Kits* (Mitosciences, Eugene, USA). Dabei handelt es sich um einen irreversibel an Protein-G Agarose gekoppelten Antikörper gegen eine Untereinheit des NADH-DHG-Komplexes der mitochondrialen Atmungskette. Mit Hilfe des Detergens Lauryl-Maltosid kann die Mitochondrienmembran aufgebrochen werden, ohne dass die Atmungskettenkomplexe dabei zerstört werden, wodurch der vollständige Komplex präzipitiert werden kann.

Um zu kontrollieren, ob Proteine präzipitiert wurden, wurde ein Ansatz über SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel im Anschluss Coomassie gefärbt (Abb. 3.16). Im Gegensatz zum mitaufgetragenen Gesamtlisat, enthält die Probe, die mit den Agarose-Beads behandelt wurde, deutlich weniger Proteinbanden. Diese werden nicht von einer Verunreinigung durch den Antikörper verursacht, wie der Kontrollansatz ohne Protein aber mit Agarose-Beads zeigt.

Mit Hilfe eines spezifischen NO₂Tyr-Antikörpers wurde eine Untereinheit von Komplex I nachgewiesen, die in Lebermitochondrien der 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäuse deutlich stärker nitriert ist als im vergleichbaren Wildtyp (Abb. 3.17).

3.3.4 Nachweis von NO und Peroxynitrit

Die verstärkte Nitrierung von Proteinen der *taut*^{-/-} -Mäuse lässt darauf schließen, dass es in den Mitochondrien zu einer verstärkten NO und damit auch zu einer verstärkten Peroxynitrit-Bildung kommt. Um dies zu überprüfen, wurden isolierte Mitochondrien aus Skelettmuskel- und Lebergewebe von 2 Monate alten Wildtyp und *taut*^{-/-} Tieren mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM Diacetat inkubiert.

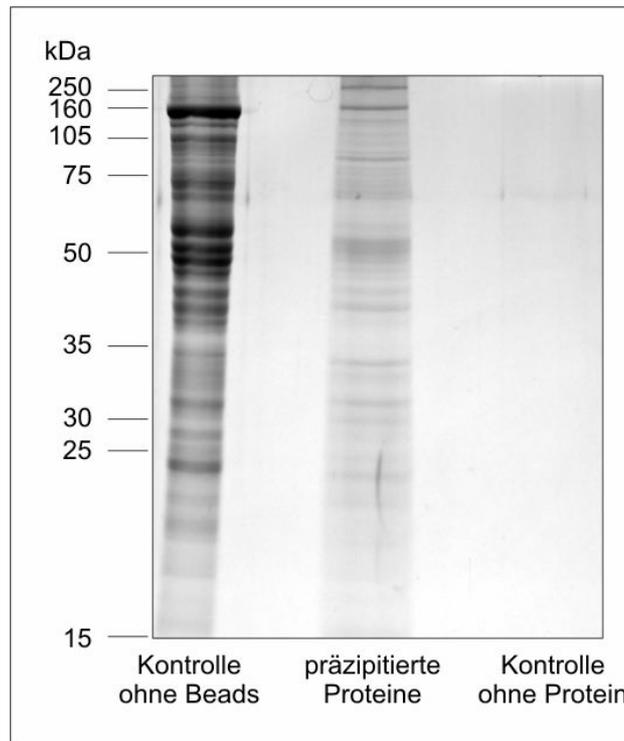


Abb. 3.16: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von mit Anti-Komplex-I-Agarosebeads präzipitierten Mitochondrienproteinen. Komplex I wurde mit Hilfe eines spezifischen, an Agarose gekoppelten, Antikörper aus Gesamtmithochondrienlysat aus der Leber von 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Tieren präzipitiert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

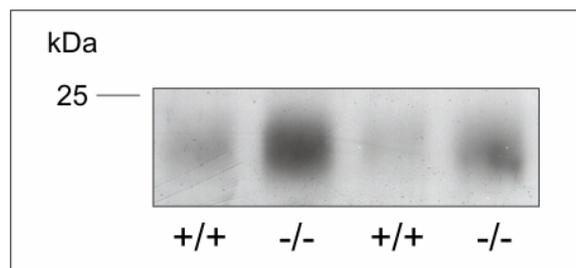


Abb. 3.17: Verstärkte Protein-Tyrosin-Nitrierung einer Komplex I Untereinheit. Präzipitierte Proteine aus Gesamtmithochondrienlysat aus der Leber von 15-16 Monate alten Wildtyp- (+/+) und *taut*^{-/-} Tieren wurden mit Hilfe eines spezifischen NO₂Tyr-Antikörpers analysiert. Der abgebildete Western Blot ist repräsentativ für je n=3 Tiere.

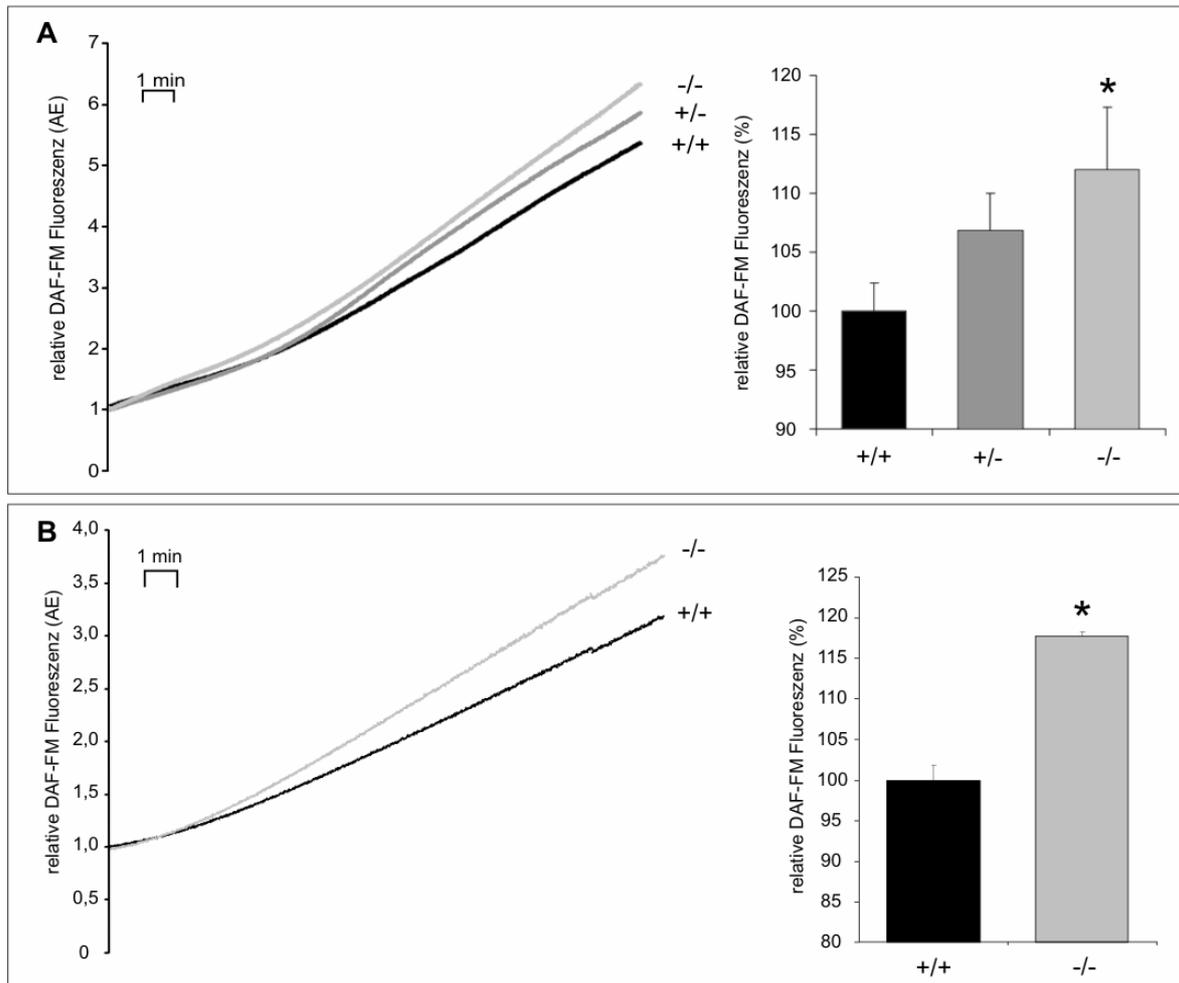


Abb. 3.18: relativer Fluoreszenzanstieg von DAF-FM in isolierten Leber- (A) und Skelettmuskelmitochondrien (B) aus 2 Monate alten *taut*^{+/+}, *taut*^{+/-} und *taut*^{-/-} Mäusen. Mitochondrien wurden aus Leber- bzw. Skelettmuskelgewebe isoliert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM DA inkubiert. Die Änderung der Fluoreszenz über die Zeit wurde in einem Fluorimeter gemessen. Die Startpunkte der jeweiligen Messung wurden auf eins gesetzt und die Folgewerte darauf normiert. Für die statistische Auswertung (jeweils rechte Abbildung) wurden die Endpunkte der Messungen (nach 15 min) miteinander verglichen.

* signifikant verschieden vom Wildtyp, Leber: n = 5-6, Skelettmuskel je n = 3 (p < 0,05)

Das membrangängige Diacetat diffundiert in das Mitochondrium, wo der Farbstoff von Esterasen zu DAF-FM deacetyliert wird, welches nach Oxidation durch NO und ONOO⁻ eine starke Fluoreszenz zeigt (KOJIMA *et al.*, 1999).

In der Leber ist in den Mitochondrien der *taut*^{-/-} Mäuse eine im Vergleich zum Wildtyp um ca. 10 % signifikant gesteigerte Fluoreszenz zu beobachten. Die relative Fluoreszenzentwicklung der heterozygoten Tiere (+/-) liegt zwischen den beiden anderen Untersuchungsgruppen (+/+, -/-) (Abb. 3.18).

In den Mitochondrien des Skelettmuskels der *taut*^{-/-} Mäuse ist ähnliches zu beobachten: bei gleicher Inkubationsdauer zeigt sich in den *taut*^{-/-} Tieren sogar ein um fast 20 % gesteigerte Fluoreszenz gegenüber den Wildtyptieren (Abb. 3.18).

Ein Anstieg der Fluoreszenz ist auch in Mitochondrienlysaten von 15-16 Monate alten Mäusen zu beobachten. Allerdings wurde hier kein Unterschied zwischen den Mitochondrien der Skelettmuskulatur aus *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Tieren beobachtet (Abb. 3.19.)

3.3.4.1 Farbstoffkontrolle

Um die Reaktivität des DAF-FM zu kontrollieren, wurden Messungen ohne Mitochondrien durchgeführt. Der Farbstoff wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNOC und ONOO⁻ sowie H₂O₂ inkubiert und anschließend die Fluoreszenz im Fluorimeter gemessen.

DAF-FM reagiert mit beiden Stickoxiden (Abb. 3.20). Im Vergleich zur Kontrolle ist die Fluoreszenz bei Stimulation mit 1 mM SNOC um fast 400 % gesteigert, die gleiche Menge ONOO⁻ führt sogar zu einer über 600 %igen Steigerung. Im Gegensatz dazu führt die Stimulation mit 1 mM H₂O₂ nur zu einem 15%igen Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 3.20).

Durch die Zugabe von Radikalfängern kann die Fluoreszenzentwicklung gehemmt werden. Lysate aus Lebermitochondrien von 2 Monate alten Wildtyptieren wurden vor der Messung der Fluoreszenz im Fluorimeter mit zwei verschiedenen Radikalfängern inkubiert. Sowohl FeTPPS, ein Katalysator für den ONOO⁻-Abbau (LAUZIER *et al.*, 2007), als auch CPTIO, ein NO-Radikalfänger (PIEPER *et al.*, 1997), können den Anstieg der Fluoreszenz um ~50 % hemmen (Abb. 3.21).

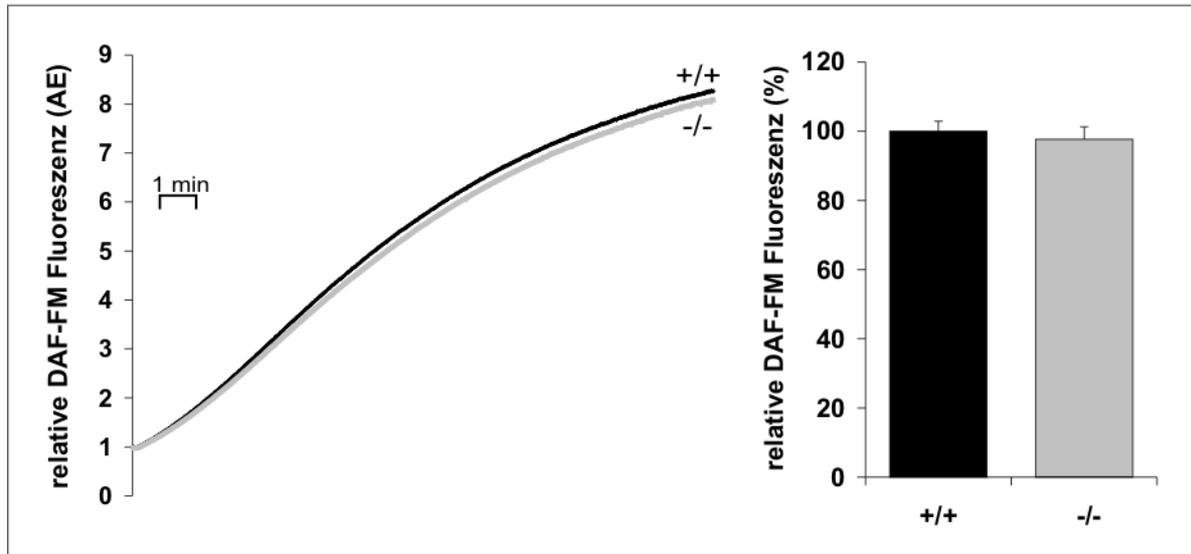


Abb. 3.19: relativer Fluoreszenzanstieg von DAF-FM im Lysat von Skelettmuskelmitochondrien aus 15-16 Monate alten *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Tieren. Lysate von Skelettmuskelmitochondrien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM DA inkubiert. Die Änderung der Fluoreszenz wurde in einem Fluorimeter gemessen. Die Startpunkte der jeweiligen Messung wurden auf eins gesetzt und die Folgewerte darauf normiert. Für die statistische Auswertung (Abbildung rechts) wurden die Endwerte der Messung (nach 15 min) miteinander verglichen. Je n=4.

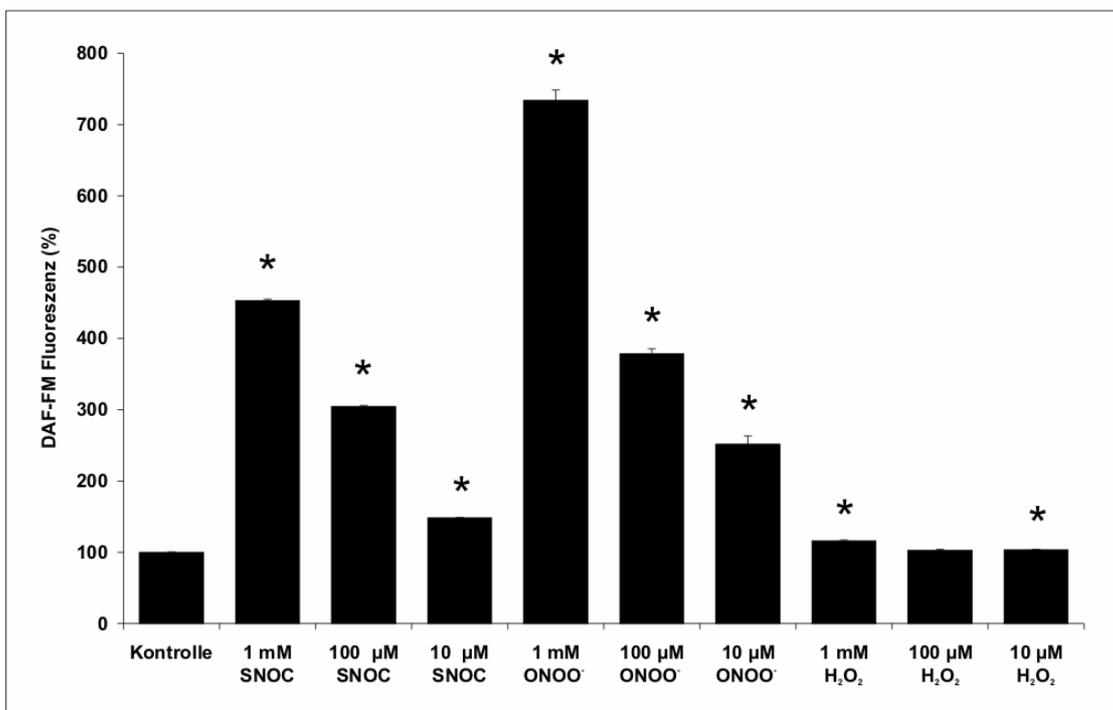


Abb. 3.20: Fluoreszenzanstieg von DAF-FM durch NO und ONOO⁻. 1 mM DAF-FM DA in 100 mM KH₂PO₄-Puffer (pH 7,0) wurde mit verschiedenen Konzentrationen von SNOC, ONOO⁻ und H₂O₂ für 30 min inkubiert, bevor die Fluoreszenz in einem Fluorimeter gemessen wurde. Die Fluoreszenzmessung des Farbstoffes ohne weitere Zusätze (Kontrolle) wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

*signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, n=4 (p<0,05)

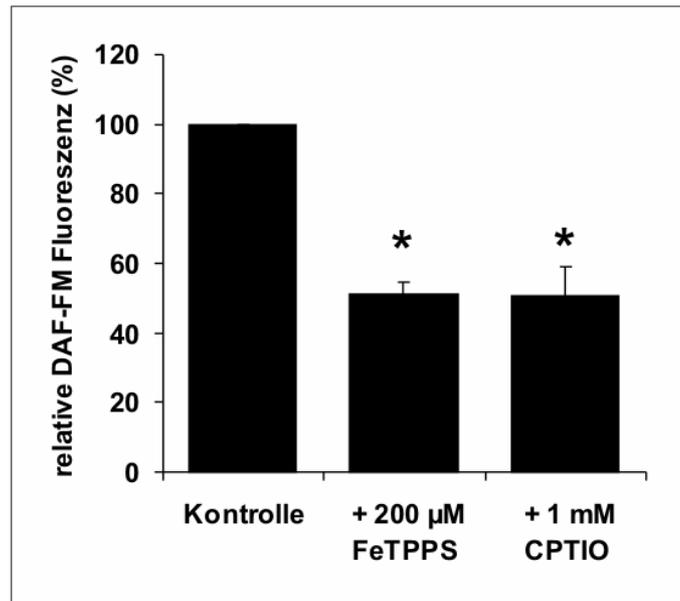


Abb. 3.21: Verringerte DAF-FM Fluoreszenz in Gegenwart von Radikalfängern in Lysaten aus Lebermitochondrien aus 2 Monate alten Tieren. Lysaten von Lebermitochondrien wurden 200 µM FeTPPS bzw. 1 mM CPTIO zugegeben, bevor die Proben mit DAF-FM DA inkubiert wurden und die Änderung der Fluoreszenz im Fluorimeter gemessen wurde.

* signifikant verschieden zur Kontrolle, n=4 (p<0,01)

3.3.4.2 Nachweis von NO-Synthasen

NO wird in der Zelle zum größten Teil von NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet. Bisher sind drei NOS bekannt: die induzierbare (iNOS), die endotheliale (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) (IGNARO *et al.*, 2000). Weiterhin soll es noch eine vierte Isoform, die mitochondriale NOS (mtNOS), geben (GHAFOURIFAR *et al.*, 2001).

Um zu überprüfen, ob die in den Mitochondrien nachgewiesene DAF-FM-Fluoreszenz auf die Bildung von NO über NO-Synthasen zurückzuführen ist, wurden die Lebermitochondrien von 2 Monate alten Wildtyptieren mit dem Breitband NOS-Inhibitor L-NMMA (N-Methyl-L-Arginin), sowie mit L-Arginin, dem Substrat der NOS, inkubiert.

Die Fluoreszenz wurde weder mit dem NOS-Inhibitor gehemmt, noch mit dem Substrat L-Arginin gesteigert (Abb. 3.22).

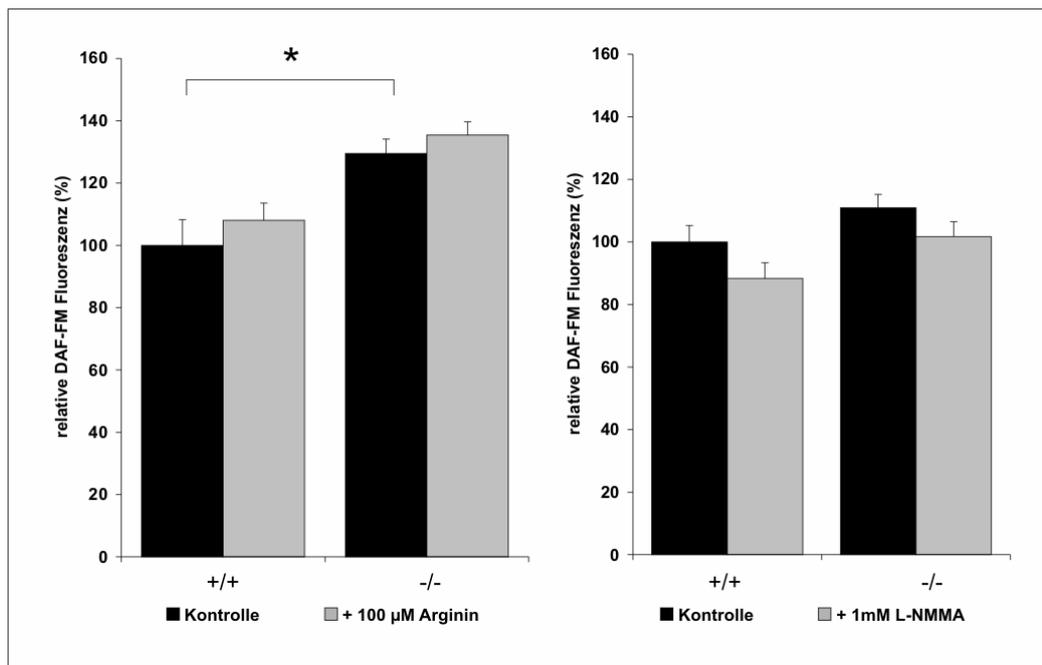


Abb. 3.22: Einfluss von Arginin und L-NMMA auf die DAF-FM-Fluoreszenz in isolierten Lebermitochondrien. Mitochondrien wurden aus Lebergewebe von 2 Monate alten Wildtyp- (+/+) und *taut*^{-/-} Tieren isoliert und anschließend mit 100 µM Arginin, bzw. 1 mM L-NMMA inkubiert, bevor DAF-FM DA zugegeben und die Fluoreszenzänderung im Fluorimeter gemessen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte für den Endpunkt der Messung (nach 30 min). Die Wildtypkontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Werte darauf normiert.

* signifikant unterschiedlich zum Wildtyp, je n= 4 (p<0,05)

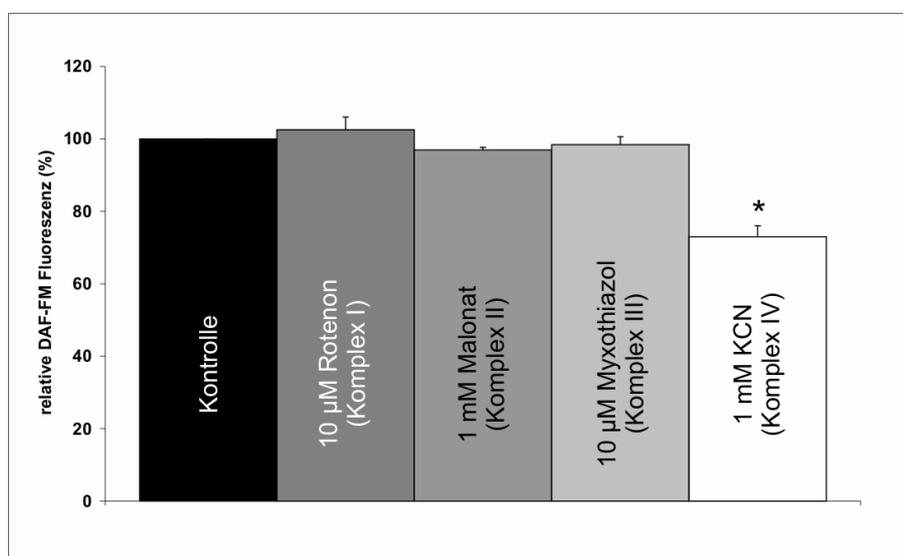


Abb. 3.23: Einfluss verschiedener Inhibitoren von Atmungskettenkomplexen auf die DAF-FM Fluoreszenz in isolierten Lebermitochondrien von Wildtyptieren. Mitochondrien wurden aus Lebergewebe von 2 Monate alten Wildtyptieren isoliert und mit Inhibitoren der verschiedenen Atmungskettenkomplexe inkubiert, bevor DAF-FM DA zugegeben und der Fluoreszenzanstieg im Fluorimeter gemessen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte für den Endpunkt der Messung (nach 60 min). Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Meßwerte darauf normiert.

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, je n=4 (p<0,05)

3.3.4.3 Atmungskettenabhängige NO-Produktion

Da beschrieben wurde, dass die verschiedenen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette NO bilden können (BUYUKAFSAR *et al.*, 2001; HENRICH *et al.* 2004; CASTELLO *et al.* 2006; LACZA *et al.* 2006), wurde überprüft, ob die gesteigerte DAF-FM Fluoreszenz der *taut*^{-/-} Mitochondrien auf einen dieser Komplexe zurückzuführen ist.

Dazu wurden die isolierten Lebermitochondrien von 2 Monate alten Wildtyptieren mit 10 µM Rotenon (hemmt die NADH-Dehydrogenase, Komplex I, WATABE *et al.*, 2007), 1 mM Malonat (Succinat-Dehydrogenase, Komplex II, GREENE *et al.*, 1993), 10 µM Myxothiazol (Coenzym Q-Cytochrom c Reduktase, Komplex III, MATSUNO-YAGI *et al.*, 2001) bzw. 1 mM KCN (Cytochrom c Oxidase, Komplex IV, CASTELLO *et al.*, 2006) inkubiert. Anschließend wurde DAF-FM zugegeben und sofort der Fluoreszenzanstieg im Fluorimeter gemessen.

Die Zugabe der Inhibitoren für die Komplexe I bis III zeigte keinen Einfluss auf die DAF-FM Fluoreszenz. Nur die Zugabe von KCN hat die Fluoreszenz von DAF-FM signifikant gesenkt, allerdings ist die Abnahme der Fluoreszenz nur relativ gering (Abb. 3.23).

3.3.4.4 pH-Abhängigkeit der DAF-FM Fluoreszenz

Zur Untersuchung, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die Bildung von NO/ONOO- im Mitochondrium von 2 Monate alten Wildtyptieren hat, wurde eine pH-Reihe erstellt. Dazu wurde der zur Inkubation genutzte MI-Puffer mit HCl auf verschiedene pH-Werte zwischen 4 und 8,5 gebracht. Anschließend wurden die isolierten Mitochondrien aus Leber und Skelettmuskel in den pH-Puffern mit DAF-FM inkubiert und die Fluoreszenz sofort im Fluorimeter gemessen.

Ausgehend von einem pH-Wert von 7,4 entwickelt sich die DAF-FM-Fluoreszenz bei höheren pH-Werten stärker (Abb. 3.24). Dies ist vor allem in den isolierten Skelettmuskelmitochondrien zu beobachten. Sinkt der pH-Wert, so ist in den Lebermitochondrien zu beobachten, dass die Fluoreszenz bei pH 7 niedriger ist als bei pH 7,4, ab pH 6,5 steigt sie allerdings wieder und ist im Vergleich zu pH 7,4 bis zu 20 % erhöht. In den Skelettmuskelmitochondrien sinkt die Fluoreszenz bis pH 6, dann bleibt sie auf einem annähernd gleichem Niveau.

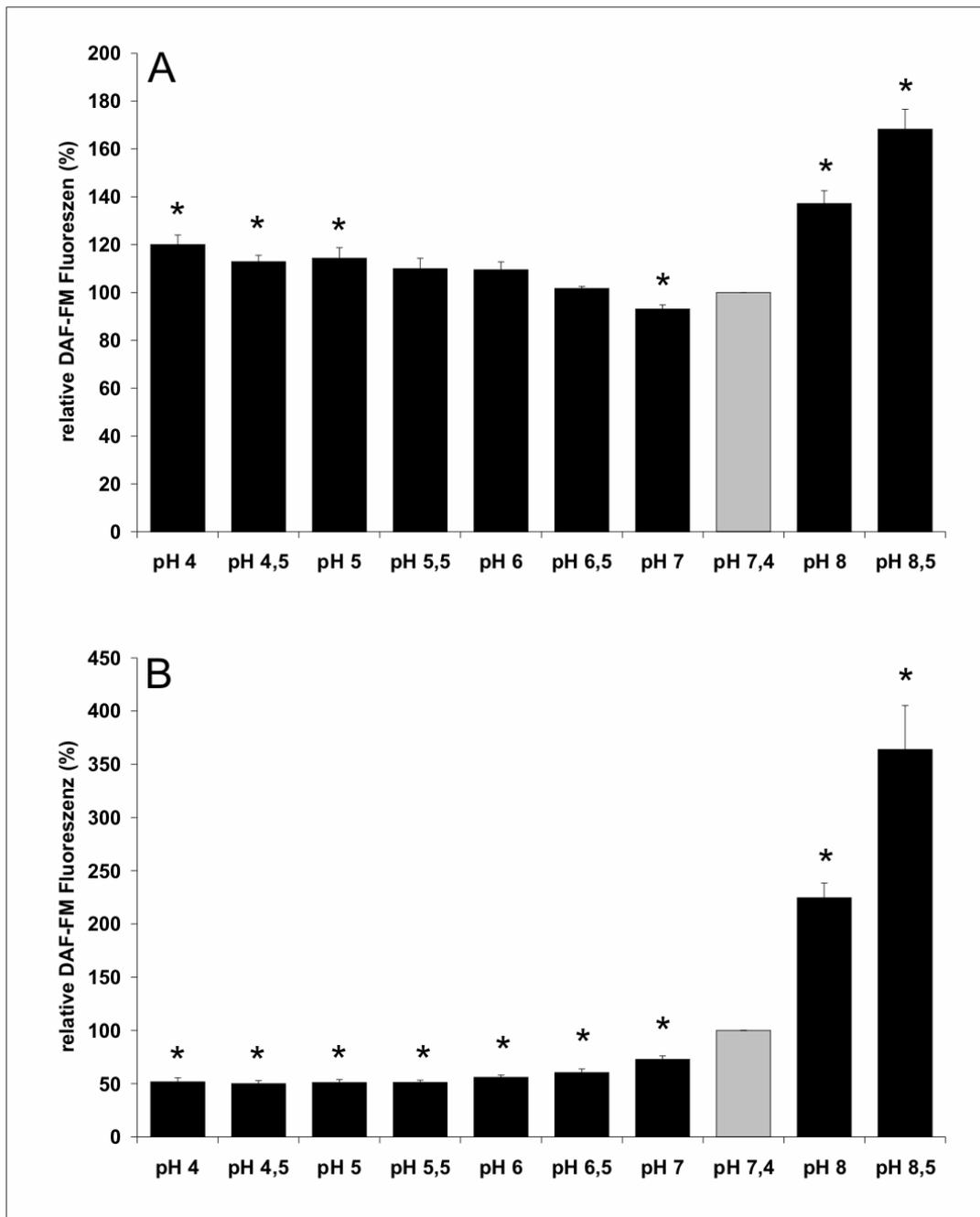


Abb. 3.24: pH-Abhängigkeit der DAF-FM-Fluoreszenz in isolierten Leber- (A) und Skelettmuskelmitochondrien (B). Isolierte Leber- und Skelettmuskelmitochondrien aus 2 Monate alten Wildtyptieren wurden in Puffer mit verschiedenen pH-Werten aufgenommen, bevor die Fluoreszenz mit Hilfe von DAF-FM gemessen wurde. Die Fluoreszenz bei pH 7,4 wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

* signifikant unterschiedlich zur Fluoreszenz bei pH 7,4, n=4 ($p < 0,05$)

3.3.4.5 Einfluss der Osmolarität auf DAF-FM Fluoreszenz

Taurin spielt unter anderem eine wichtige Rolle als Osmolyt (HUXTABLE, 1992). Deshalb wurde der Einfluss verschiedener Osmolaritäten auf das Mitochondrium untersucht.

Isolierte Mitochondrien aus Lebern von 2 Monate alten Wildtypmäusen wurden in Puffer verschiedener Osmolaritäten gegeben und anschließend wurde sofort die DAF-FM-Fluoreszenz in einem Fluorimeter gemessen. Während die Mitochondrien in einer hypertonen Umgebung im Vergleich zum isotonen Puffer keinen Unterschied in der DAF-FM-Fluoreszenz entwickeln, ist bei den Mitochondrien im hypotonen Puffer zu Beginn ein fast 10%iger signifikanter Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.25).

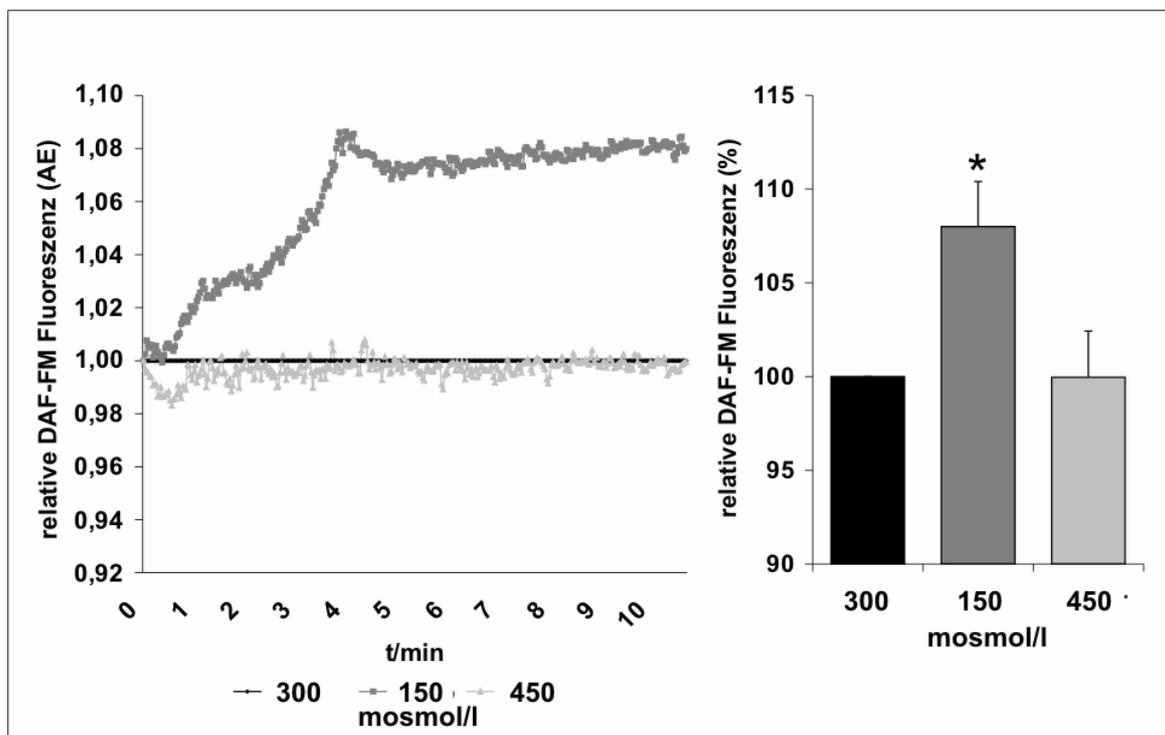


Abb. 3.25: Einfluss verschiedener Osmolaritäten auf die DAF-FM Fluoreszenz. Isolierte Mitochondrien wurden in Puffer verschiedener Osmolaritäten gegeben, bevor sofort im Anschluss die DAF-FM-Fluoreszenz im Fluorimeter gemessen wurde. Für die statistische Auswertung (Abbildung rechts) wurden die Endwerte der Messung miteinander verglichen.

*signifikant unterschiedlich im Vergleich zu 300 mosmol/l, n=4 (p<0,05).

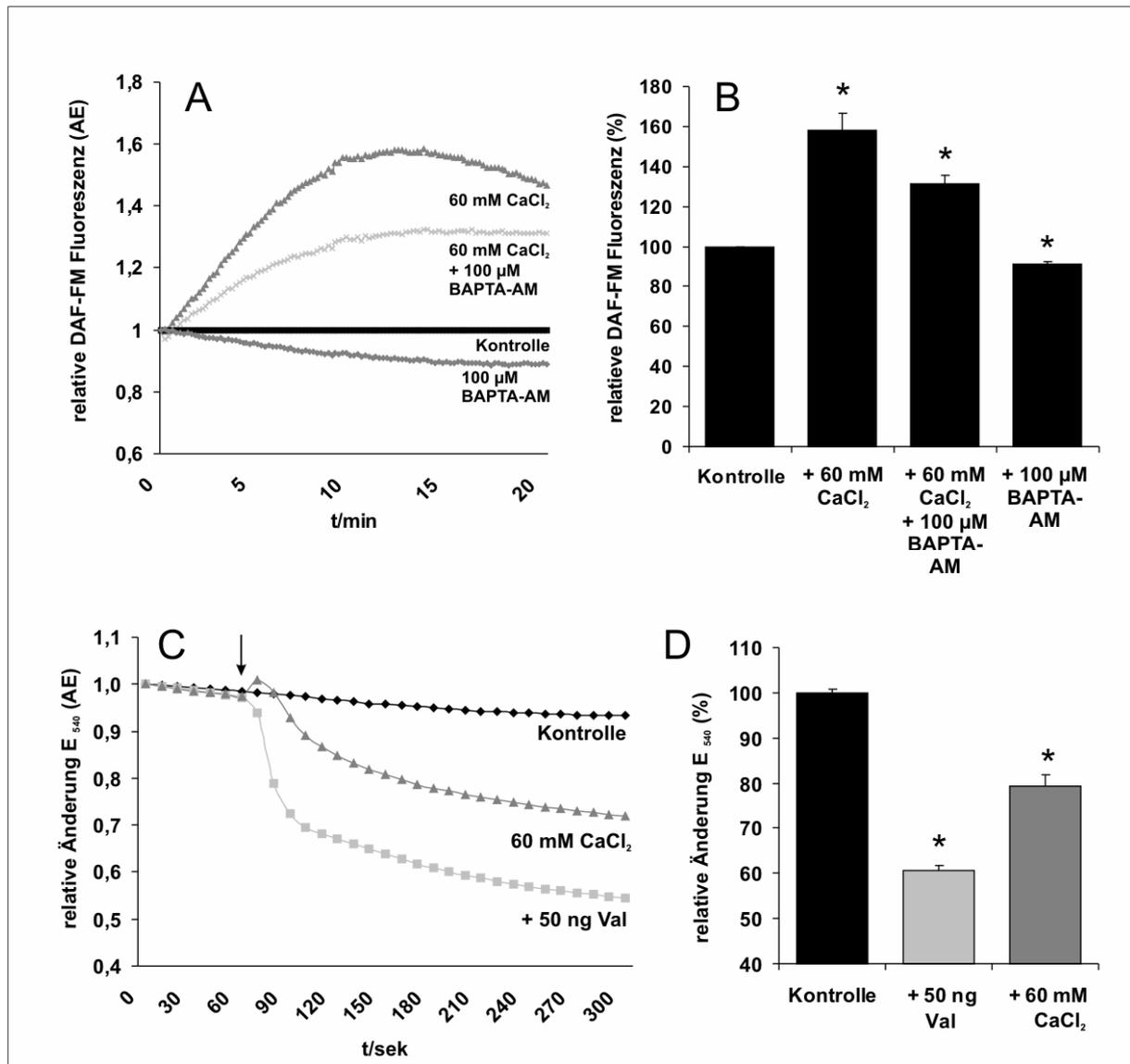


Abb. 3.26: Ca²⁺ induzierte gesteigerte DAF-FM Fluoreszenz und Mitochondrienschwellung in Lebermitochondrien von 2 Monate alten Wildtypmäusen.

A: Isolierte Lebermitochondrien von 2 Monate alten Wildtypmäußen wurden CaCl₂ und BAPTA-AM zugegeben, bevor die DAF-FM Fluoreszenz im Fluorimeter gemessen wurde. B: statistische Auswertung der Fluoreszenzentwicklung im Maximum der DAF-FM Fluoreszenz (10 min nach Start der Messung) nach CaCl₂-Stimulation. Der Fluoreszenzwert der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Messungen darauf normiert. C: Messung der Schwellung von isolierten Mitochondrien über *Lightscattering*. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von 60 mM CaCl₂ bzw. 500 nM Valinomycin (Val). D: Für die statistische Auswertung der Mitochondrienschwellung wurden die Endpunkte der Messung (nach 5 min) miteinander verglichen. Der Kontrollwert wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Messungen darauf normiert.

Für die Normierung der zeitabhängigen Messungen (A und C) wurde der Startwert der jeweiligen Messung auf 1 gesetzt und die Folgewerte darauf bezogen.

*signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, n=3-4 (p<0,05).

Eine Änderung der externen Osmolarität verursacht eine Änderung des Zellvolumens (HÄUSSINGER *et al.*, 1990; LANG, 2007). Zur Kontrolle, ob das Schwellen der Mitochondrien im hypotonen Puffer die gesteigerte DAF-FM Fluoreszenz verursacht, wurden die isolierten Mitochondrien mit CaCl_2 stimuliert.

Auch die Stimulation von CaCl_2 verursacht verglichen zur Kontrolle eine anfangs verstärkte Fluoreszenzentwicklung (Abb. 3.26). Die Fluoreszenz steigt innerhalb der ersten 10 Minuten um 60 % an, nach Erreichen dieses Maximums nimmt sie im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle jedoch wieder ab. Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM hemmt diesen Anstieg teilweise. Wird den Mitochondrien nur BAPTA-AM zugegeben, so ist sogar eine leichte signifikante Abnahme der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

Zur Überprüfung, ob CaCl_2 Mitochondrien zum Schwellen bringt, wurde ein Lightscattering-Versuch durchgeführt. Dazu wurde die Extinktion einer Mitochondriensuspension im Photometer gemessen. Nach Zugabe von 60 mM CaCl_2 ist eine deutliche Abnahme der Extinktion zu beobachten, was auf das Schwellen der Mitochondrien zurückzuführen ist (Abb. 3.26). Auch die Zugabe des Ionophors Valinomycins verursacht eine Abnahme der Extinktion.

3.3.4.6 NO-Freisetzung aus Speicherproteinen

NO kann über Disulfidbrücken an Proteine gebunden und gespeichert werden (STEFFEN *et al.*, 2001; AL-ANI *et al.*, 2006). Mit Hilfe von Dithiothreitol (DTT) können diese Disulfidbrücken reduziert und aufgebrochen werden (AL-ANI *et al.*, 2006).

Die Inkubation von isolierten Mitochondrien mit DTT führt zu einer stark erhöhten Fluoreszenz von DAF-FM (Abb. 3.27). ~20 min nach Start der Messung ist die Fluoreszenz der mit DTT behandelten Proben um über 150 % gestiegen. Innerhalb der nächsten 20 Minuten steigt die Fluoreszenz nur noch leicht an und erreicht nahezu ein Plateau.

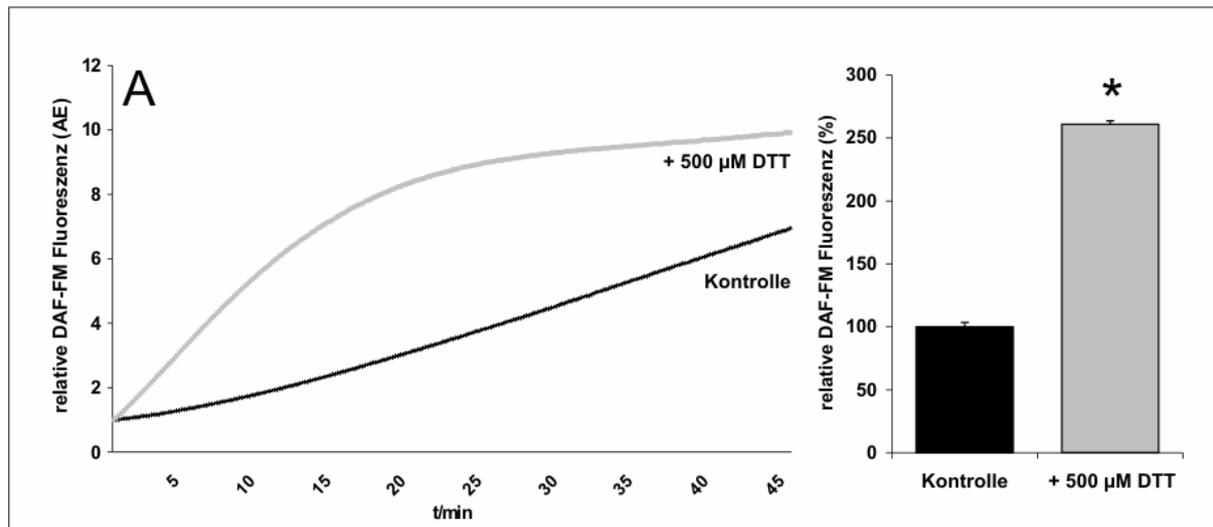


Abb. 3.27: Gesteigert DAF-FM Fluoreszenz in Skelettmuskelmitochondrien nach Zugabe von 500 µM DTT. Mitochondrien wurden aus der Skelettmuskulatur isoliert. Vor der Messung der DAF-FM Fluoreszenz wurden 500 µM Dithiotreitol (DTT) zugegeben. Die statistische Auswertung (rechte Abbildung) erfolgte für den Zeitpunkt 20 min nach Start der Messung.

*signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, n=4 ($p < 0,05$).

4 Diskussion

Taurin ist die am häufigsten vorkommende freie Aminosäure in den meisten eukaryotischen Zellen (HUXTABLE, 1992). Es spielt bei zahlreichen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle: es ist an der Zellvolumenhomöostase beteiligt, wirkt antioxidativ, proteinstabilisierend und immunmodulatorisch (HUXTABLE, 1992; DELLA CORTE, 2000).

Zur Untersuchung der Bedeutung von Taurin im Organismus wurde eine Taurintransporter-Knockoutmaus (*taut*^{-/-}) generiert, bei der die Taurinspiegel verschiedener Gewebe stark reduziert sind (HELLER-STILB *et al.*, 2002). Studien dieser Maus zeigten außerdem verschiedene, z.T. altersabhängig auftretende Auffälligkeiten, wie z.B. Degeneration der Retina, verminderte Leistungsfähigkeit und chronische Lebererkrankungen (HELLER-STILB *et al.*, 2002; WARSKULAT *et al.*, 2004 & 2006).

Die *taut*^{-/-} Maus zeigt weiterhin Veränderungen der Mitochondrien. So wurde in der Leber eine veränderte Morphologie, aber auch eine physiologische Beeinträchtigung gezeigt (WARSKULAT *et al.*, 2006).

Mitochondrien sind an vielen wichtigen Prozessen (ATP-Synthese, Apoptoseregulation, Generierung von Fe-S-Clustern) beteiligt (WALLACE, 1999; LILL *et al.*, 2006). Deshalb führen Defekte an den Mitochondrien zu vielen unterschiedlichen Krankheiten, z.B. Diabetes, Neuro- und Myopathien (KADOWAKI *et al.*, 1994; WALLACE, 1999; DIMAURO *et al.*, 2003). MtDNA Mutationen wurden außerdem mit frühzeitiger Alterung in Verbindung gebracht (TRIFUNOVIC *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss, den Taurinmangel auf das Mitochondrium hat, näher charakterisiert.

4.1 Taurinmangel und Integrität des mtGenoms

Im Skelettmuskel der *taut*^{-/-} Maus ist der Taurinspiegel um über 98 % reduziert (WARSKULAT *et al.*, 2004). Dies hat Auswirkungen auf die Funktion des Skelettmuskels: er ist in seiner Belastbarkeit stark eingeschränkt, was mit einer Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit und einem Anstieg der Lactat-Freisetzung einhergeht.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich Veränderungen der mitochondrialen DNA (mtDNA) im Skelettmuskel der *taut*^{-/-} Maus beobachtet. Über quantitative Real-time-PCR-Analyse wurde ein signifikanter Anstieg der Menge an D13 mtDNA⁴⁹⁷⁴ Deletionen, denen eine zentrale Rolle beim Alterungsprozess zukommt, im Skelettmuskel von 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäusen nachgewiesen.

Deletionen der mtDNA wurden schon zuvor in verschiedenen Geweben älterer Mäuse, u.a. des Skelettmuskels und der Leber, nachgewiesen (BROSSAS *et al.*, 1994; TANHÄUSER *et al.*, 1995; EIMON *et al.*, 1996). Häufig werden solche Schäden mit degenerativen Erkrankungen und dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht (WALLACE *et al.*, 1999; KRISHNAN *et al.*, 2007). Bisher identifizierte Deletionen unterscheiden sich in ihrer Größe und Position und betreffen Gene, die essentiell für die oxidative Phosphorylierung sind, sowie die 24 RNAs, die für ihre Synthese benötigt werden (ANDERSON *et al.*, 1981). Eine der am Besten untersuchten mtDNA-Deletionen im Menschen ist die so genannte *Common Deletion* mit einer Größe von 4977 bp. Die *Common Deletion* wurde in zahlreichen Geweben nachgewiesen und ihre Häufigkeit nimmt mit dem Alter zu (OZAWA *et al.*, 1999). Dieser altersabhängige Anstieg (auch von anderen Deletionen) ist vermutlich auf das Fehlen von Histonen und ineffiziente Reperaturmechanismen der mtDNA zurückzuführen (CROTEAU *et al.*, 1999). Die Menge einzelner, während des Alterungsprozesses auftretender, mtDNA Mutationen ist nur gering, sie machen oft weniger als 0,01 % der gesamten mtDNA aus (TANHÄUSER *et al.*, 1995; CORTOPASSI *et al.*, 1992). Trotzdem ist das Auftreten der *Common Deletion* ein Biomarker für die physiologische Zellalterung (BERNEBURG *et al.*, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Deletionen D1, D3 und D13 ähneln von Größe und Position der *Common Deletion*, wobei D13 der *Common Deletion* am stärksten entspricht.

Die in der *taut*^{-/-} Maus nachgewiesene D13 kommt im Skelettmuskel und in der Leber 15-16 Monate alter Tiere mit einer Häufigkeit von ~0,001 % vor (Abb. 3.5). mtDNA^{3867bp} (D1) trat 10mal, mtDNA^{3726bp} (D3) sogar 1000mal seltener auf. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass beide Deletionen innerhalb der größeren D13 liegen. Für das Auftreten von D1 in der Innenohrschnecke wurde eine wichtige Rolle bei Altersschwerhörigkeit von Mäusen beschrieben (ZHANG *et al.*, 2002). Im Muskel scheint sie eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, ebenso wie die D3-Deletion.

D13 tritt im Skelettmuskel 15-16 Monate alter *taut*^{-/-} Tiere signifikant häufiger auf als im entsprechenden Wildtyp. Dies lässt darauf schließen, dass Taurinmangel Einfluss auf die Integrität des mtGenoms hat. Möglicherweise liegt hier die Ursache für die Beeinträchtigung der Muskelfunktion in der Taurin defizienten Maus (WARSKULAT *et al.*, 2004). Verschiedene andere Mausmodelle, wie die *Pstl*- und die Twinkle-Maus, haben ebenfalls gezeigt, dass ein vermehrtes Auftreten von mtDNA Deletionen mit Myopathien einhergeht (SRIVASTAVA *et al.*, 2005; TYYNISMAA *et al.*, 2005). Allerdings ist der Unterschied in der Häufigkeit der Deletionen zwischen Wildtyp und *taut*^{-/-} verglichen mit dem altersabhängigen Anstieg eher gering und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Anstieg nur eine untergeordnete Rolle bei der Ausbildung von Myopathien spielt. Es wird diskutiert, dass erst ein bestimmter Schwellenwert an mutierten mtDNA-Kopien erreicht sein muss, bevor ein Einfluss auf die Zellphysiologie sichtbar wird (COLLER *et al.*, 2002). Patienten mit dem Kearns-Sayre-Syndrom, einer mitochondrialen Myopathie, besitzen z.B. 20-80 % an deletierten mtDNA-Molekülen, bevor sich Krankheitssymptome zeigen (CHINNERY *et al.*, 1999; WALLACE, 1999).

4.2 Kardiale Genexpression in *taut*^{-/-} Mäusen

Auch im Herzmuskel von *taut*^{-/-} kommt es wie im Skelettmuskel zu einer extremen Reduktion der Taurinspiegel (HELLER-STILB *et al.*, 2002, WARSKULAT *et al.*, 2004). Trotzdem zeigen die Tiere eine annähernd normale Herzfunktion. Auch das im Skelettmuskel von *taut*^{-/-} Mäusen nachgewiesene vermehrte Auftreten von mtDNA D13-Deletionen wurde im Herzen dieser Tiere nicht beobachtet. Die D13-Deletionen treten außerdem viel seltener auf als im Skelettmuskel (Abb. 3.6). Im Gegensatz zum Skelettmuskel wird der Mangel an Taurin im Herzen durch andere organische Osmolyte kompensiert, z.B. Glutamin, Alanin, Acetat und Glycin (WARSKULAT *et al.*, 2004). Dies kann auch der Grund dafür sein, dass die Grundfunktion des Herzens in *taut*^{-/-} Mäusen unverändert ist und Deletionen im Herzen seltener als im Skelettmuskel auftreten. Dennoch zeigen die Tiere Veränderungen des Zytoskeletts und ein verstärktes Auftreten von Risikofaktoren klinisch relevanter Herzerkrankungen.

Über DNA-Microarray- und Genexpressionsanalysen des Herzens wurde gezeigt, dass es in *taut*^{-/-} Tieren zu einer Änderung der Expression von Alpha-Aktin

Isoformen kommt (Tabelle 3.2, Abb. 3.7). Aktin-Isoformen haben sich als nützliche Marker in verschiedenen Erkrankungen (Hypertrophie, Herzversagen) etabliert (CHAPONNIER *et al.*, 2004). In Vertebraten gibt es sechs verschiedene Isoformen von Aktin, die sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1978). Die Ausbildung der verschiedenen Isomere ist sowohl entwicklungs- als auch gewebsspezifisch (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1978; MCHUGH *et al.*, 1991). Acta2 (*skeletal alpha-actin* Typ 2) wird bei der Differenzierung von Kardiomyozyten gebildet und im weiteren Verlauf der Entwicklung durch Acta1 und Actc1 ersetzt, die dann im adulten Herzmuskel die Aktine der Sarkomere darstellen (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1986; RUZICKA *et al.*, 1988; WOODCOCK-MITCHELL *et al.*, 1988).

Die Kontraktionsfähigkeit von Mausherzen und die Menge an Acta1 scheinen in enger Beziehung zueinander zu stehen: perfundierte Herzen aus Mäusen, die hohe Mengen an Acta1 exprimieren sind hyperdynamisch, was vermuten lässt, dass die maximale Kontraktionshäufigkeit proportional zur Menge der mRNA für dieses Protein ist (HEWETT *et al.*, 1994). Mutationen im Acta1 Gen wurden außerdem in verschiedenen Myopathien nachgewiesen (CLARKSON *et al.*, 2004). Auch wenn in den Herzen von *taut*^{-/-} Mäusen Acta1 herab- und Acta2 heraufreguliert ist, zeigen sie keine veränderte Herzfunktion (WARSKULAT *et al.*, 2004). Nur die Vasodilatation ist in isolierten, perfundierten *taut*^{-/-} Herzen nach Dobutamin Stimulation erhöht. Interessanterweise wird Acta2 in hohen Mengen in alten Myokardialnarben exprimiert, möglicherweise auf Grund der ständigen Belastung durch Druck (SUN *et al.*, 1996).

Neben der Expressionsänderung der Aktin-Isoformen wurde außerdem beobachtet, dass verschiedene Biomarker für Hypertonien und kardiale Hypertrophien im Herzen von 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Tieren hochreguliert sind (Tabelle 3.1 und 3.2).

Der atriale natriuretische Faktor (ANF) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdruckes und wird zum größten Teil von den Myozyten im Atrium bei erhöhtem Druck und Überdehnung der Herzvorhofwand ausgeschüttet (RUBATTU *et al.*, 2001). Außerdem ist ANF an der Regulation des Wasserhaushalts beteiligt. Sowohl ANF als auch BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) wirken kardioprotektiv, u.a. wegen ihrer diuretischen, natriuretischen und vasodilatatorischen Eigenschaften (NISHIKIMI *et al.*, 2006).

Obwohl der Herzmuskel der *taut*^{-/-} Mäuse keinen auffälligen Phänotypen hat, deutet die Hochregulation kardioprotektiv wirkender Gene auf eine Stresssituation hin. Ein

weiterer Hinweis darauf ist die verstärkte Protein-Tyrosin-Nitrierung (PTN) von mitochondrialen Proteinen im Herzen von 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäusen durch Peroxynitrit (Abb. 3.15). Die PTN ist eine post-translational auftretende Modifikation von Proteinen unter oxidativem Stress, deren vermehrtes Auftreten bei vielen Krankheiten u.a. bei Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wurde (GREENACRE *et al.*, 2001; TURKO *et al.*, 2002 & 2003). Durch die Nitrierung wird die Struktur und Funktion von Proteinen verändert, was meistens zur Inhibierung der Proteine führt (ISCHIROPOULOS, 1998, GREENACRE *et al.*, 2001). Peroxynitrit kann außerdem Schäden an der mtDNA verursachen, was zu einer Schädigung der Mitochondrien führt (COVER *et al.*, 2005).

Zwei mitochondriale Symptome, die aus Mutationen der mtDNA resultieren, werden u.a. auch mit einer Hypertrophie in Verbindung gebracht: MELAS (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*) und MERRF (*myoclonus epilepsy with ragged red fibers*) (ANAN *et al.*, 1995). Für beide ist eine Myopathie im Skelettmuskel typisch, wie sie auch in der *taut*^{-/-} Maus beobachtet wurde (LÜSEBRINK *et al.*, 2008). Auch der Mangel an Taurin enthaltenden tRNAs ist mit beiden Krankheiten assoziiert (SUZUKI *et al.*, 2002).

Taurinmangel führt möglicherweise im Herzen von *taut*^{-/-} Mäusen zu einer Schädigung von Mitochondrien, was in einer gesteigerten Produktion von oxidativem Stress resultiert. Unter stressarmen Laborbedingungen hat dies anscheinend keine Auswirkungen. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass *taut*^{-/-} Tiere wesentlich anfälliger für Herzversagen unter Stressbedingungen sind, wie sie in der Natur vorkommen.

4.3 Taurinmangel und Bildung von RNS im Mitochondrium von Mäusen

Nicht nur im Herzen, sondern auch im Skelettmuskel und in der Leber kommt es zu einer signifikant erhöhten Protein-Tyrosin-Nitrierung von mitochondrialen Proteinen in *taut*^{-/-} Mäusen (Abb. 3.15). Die PTN ist ein deutlicher Hinweis auf die Bildung von Peroxynitrit (GREENACRE *et al.*, 2001). Peroxynitrit wird in einer diffusionsgesteuerten Reaktion zwischen Stickstoffmonoxid und dem Superoxidradikalanion gebildet (KISSNER *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit zeigten Fluoreszenzmessungen mit Hilfe des Farbstoffes DAF-FM DA, dass es im Vergleich zu Wildtypmitochondrien sowohl in 2 als auch in 15-16 Monate alten *taut*^{-/-} Mäusen zu einer erhöhten Fluoreszenzbildung kommt.

Diaminofluoreszeine wie DAF-FM reagieren mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Benzotriazolen, was zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz führt (KOJIMA *et al.*, 1999). Allgemein werden diese Farbstoffe zur Messung der NO-Produktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt (KASHIWAGI *et al.*, 2002; LORENZ *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2004). Aufgrund der starken DAF-FM-Fluoreszenzsignale ist anzunehmen, dass Mitochondrien hohe Konzentrationen an NO produzieren können. Dies steht jedoch im Kontrast zu einer eher geringen bzw. nicht vorhandenen NOS (NO-Synthase) Aktivität (LACZA *et al.*, 2003; LACZA *et al.*, 2004; TAY *et al.*, 2004). Außerdem wurde in Kontrollmessungen gezeigt, dass DAF-FM auch mit Peroxynitrit (ONOO⁻) reagiert und dass diese Reaktion im Vergleich zu der Reaktion mit NO zu einer stärkeren Fluoreszenz führt (Abb. 3.19). Da Mitochondrien die Hauptquelle für Superoxid sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass entstehendes NO zu Peroxynitrit reagiert. So haben verschiedene Studien gezeigt, dass DAF-FM-Fluoreszenz in Anwesenheit anderer Oxidantien wie Superoxid und ONOO⁻ signifikant höher ist (LACZA *et al.*, 2005). Die mit der erhöhten DAF-FM Fluoreszenz einhergehende verstärkte PTN in *taut*^{-/-} Mäusen lässt zusätzlich darauf schließen, dass die Farbstoffreaktion im Mitochondrium nicht nur auf NO-Bildung, sondern auch auf die Bildung anderer Stickstoffradikale zurückzuführen ist.

Wie in anderen Studien (LACZA *et al.*, 2005; CASTELLO *et al.*, 2006) wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass weder der Einsatz hoher Konzentrationen des Breitband-NOS-Inhibitors L-NMMA, noch die Zugabe des NOS-Substrats L-Arginin zu einer Veränderung der Fluoreszenz führt (Abb. 3.22). Auch in Untersuchungen von eNOS-, nNOS- bzw. iNOS-Knockoutmäusen wurde keine Veränderung der Fluoreszenz im Vergleich zu den Wildtyptieren beobachtet (LACZA *et al.*, 2004). Daher scheint es eher unwahrscheinlich, dass eine klassische NOS in der NO-Produktion im Mitochondrium involviert ist.

Der Einsatz spezifischer Inhibitoren von NO und ONOO⁻ führte in beiden Fällen zu einem 50 %igen Abfall der Fluoreszenz (Abb. 3.21), was zusätzlich dafür spricht, dass DAF-FM im Mitochondrium nicht nur mit NO reagiert.

Auch den verschiedenen Atmungskettenkomplexen wurde in der Vergangenheit schon eine Beteiligung an der NO-Synthese im Mitochondrium zugeschrieben. Die

Gruppe um LACZA (2006) identifizierte z.B. Komplex I als mögliche Quelle von RNS (radikale Stickstoffspezies), während in einer Arbeit von CASTELLO *et al.* (2006) gezeigt wurde, dass Komplex IV unter Hypoxie NO bildet. Der Einsatz von Inhibitoren der einzelnen Atmungskettenkomplexe in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass es nur in Anwesenheit von Kaliumzyanid zu einer Veränderung der DAF-Fluoreszenz kam (Abb. 3.23). Dieser ist jedoch relativ gering und daher ist eher davon auszugehen, dass Komplex IV nur eine untergeordnete Rolle bei der Bildung von RNS im Mitochondrium der Maus spielt.

Messungen der DAF-FM-Fluoreszenz unter verschiedenen pH-Werten ergaben, dass die Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle (pH 7,4) unter höheren pH-Bedingungen wesentlich stärker ist, als bei einem niedrigerem pH. Peroxynitrit ist bei einem hohen pH relativ stabil, während es bei pH-Werten unter pH 7,4 viel schneller zerfällt (COUPE *et al.*, 1999). Möglicherweise kommt es in den Mitochondrien der *taut*^{-/-} Tiere zu einer pH-Verschiebung ins Basische, was die Stabilität des ONOO⁻ begünstigt.

Taurin spielt im Körper eine wichtige Rolle als Osmolyt (HUXTABLE, 1992). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass Lebermitochondrien von *taut*^{-/-} Mäusen geschwollen erscheinen (WARSKULAT *et al.*, 2006). Werden isolierte Mitochondrien in einem hypotonen Puffer inkubiert, kommt es zu einer erhöhten DAF-FM Fluoreszenz (Abb. 3.25). Auch Stimulation mit hohen Konzentrationen von Ca²⁺ führt zum Schwellen von Mitochondrien (Abb. 3.26 c und d). Gleichzeitig führt die Inkubation mit Ca²⁺ genau wie die Inkubation im hypotonen Puffer zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 3.26 a und b). Nach relativ kurzer Zeit erreicht die Fluoreszenz jedoch ein Maximum und sinkt dann. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Mitochondrien durch die hohe Belastung relativ schnell zerstört werden.

Hypoosmotisches Schwellen von Zellen wurde mit einer vermehrten Bildung von PTN in Verbindung gebracht (SCHLISS *et al.*, 2004). Die Vermutung liegt nahe, dass das Schwellen von Mitochondrien Einfluss auf vermehrte Peroxynitritbildung hat. Aufgrund des Taurinmangels können die Mitochondrien eine Änderung des Volumens nicht mehr ausgleichen und es käme zu der beobachteten starken PTN.

Eine weitere Quelle für mitochondrial gebildete RNS können Nitrosothiole sein. Mitochondrien können NO von außerhalb aufnehmen und in der Form von Nitrosothiolen speichern (STEFFEN *et al.*, 2001; AL-ANI *et al.*, 2006). Werden isolierte

Mitochondrien mit Dithiothreitol (DTT) inkubiert, so kommt es tatsächlich zu einem schnellen, sehr starken Anstieg der DAF-FM-Fluoreszenz, der jedoch nach wenigen Minuten stagniert (Abb. 3.27). Interessanterweise kann DTT Sulfidbrücken durch deren Reduktion zerstören und somit zur Freisetzung von NO führen (AL-ANI *et al.*, 2006). Neben der Freisetzung von NO aus Speicherproteinen können Mitochondrien organische Nitrate in RNS umwandeln (CHEN *et al.*, 2002; MCGUIRE *et al.*, 1998). Auch die Bildung von NO aus Nitrit wurde beschrieben (KOSZLOV *et al.*, 1999; NOHL *et al.*, 2000).

Die Quelle der RNS Bildung in Mitochondrien bleibt weiter unklar. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass mehrere Prozesse zur Bildung dieser Stickstoffradikale führen. Welcher dieser Prozesse für die vermehrte RNS Bildung im Mitochondrium von *taut*^{-/-} Tieren ausschlaggebend ist, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

4.4 Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette in *taut*^{-/-} Mäusen

Taurinmangel hat einen Einfluss auf die Aktivität der Atmungskette. Sowohl im Muskel als auch in der Leber wurde gezeigt, dass der Atmungskontrollkoeffizient in *taut*^{-/-} Mitochondrien um ~30 % niedriger ist, als in denen der Wildtypiere (WARSKULAT *et al.*, 2006; LÜSEBRINK *et al.*, 2008). Untersuchungen verschiedener Atmungsgruppenkomplexe mittels Western Blot-Analyse haben unterschiedliche Auswirkungen des Taurinmangels auf die Mitochondrien von *taut*^{-/-} Mäusen in Leber und Skelettmuskel gezeigt (Abb. 3.13). Im Muskel der 15-16 Monate alten Tiere kommt es zu einer Herabregulation von Komplex I. Dies ist möglicherweise auf eine stärker geschädigte mtDNA in der Skelettmuskulatur von *taut*^{-/-} Mäusen zurückzuführen (Abb. 3.4). Die Cytochrom c Oxidase (COX) ist heraufreguliert, ihre Aktivität im Skelettmuskel des Wildtyps und der *taut*^{-/-} Maus zeigt aber keinen Unterschied (Abb. 3.12). COX kann von NO inhibiert werden (ALMEIDA *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2002). Möglicherweise wird COX stärker exprimiert, um einen Funktionsverlust durch die RNS induzierte Inhibierung des Enzyms auszugleichen. Im Gegensatz zum Muskel gibt es in der Leber keine Veränderung der Expression von Komplex I. Dafür wurde aber eine stärkere Nitrierung einer Untereinheit des Komplexes in der Leber der *taut*^{-/-} Maus nachgewiesen (Abb. 3.17). COX und Cytochrom c (Cyt c) zeigten hier beide eine deutlich verminderte Expression (Abb.

3.13). Die verminderte Expression von COX geht auch mit einer um ~20 % verringerten Aktivität des Komplexes einher (Abb. 3.12). Zwar wurden im mtGenom der Leber von Knockout- und Wildttypieren keine Unterschiede in der Häufigkeit von Deletionen nachgewiesen (Abb. 3.5), eine stärker geschädigte mtDNA in *taut*^{-/-}-Mäusen kann aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden, da nur drei ausgewählte Deletionen untersucht wurden, die nur einen Teil der möglichen Deletionen des mtGenoms repräsentieren (TANHÄUSER *et al.*, 1995). Neben Deletionen können auch verschiedene Punktmutationen auftreten, welche schwerwiegende Auswirkungen auf den Organismus haben können (WALLACE 1999). Die Punktmutationen mtDNA3242 und mtDNA8344 werden z.B. mit den Mitochondriopathien MELAS und MERRF assoziiert, bei denen es u.a. zu Myopathien und Hörverlust kommt. Punktmutationen, aber auch andere Veränderungen der mtDNA, können von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und RNS verursacht werden, wie z.B. die Bildung von 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (8-OHdG) oder die Umwandlung von Cytosin zu Uracil (REDDY *et al.*, 2007). Auch eine Schädigung der nukleären DNA (nDNA) kann für die veränderte Expression verantwortlich sein, da die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe mit Ausnahme des Komplexes II sowohl im Kern als auch im Mitochondrium kodiert werden (WALLACE *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2005).

Neben dem unterschiedlichen Expressionsmuster der Atmungskettenkomplexe in *taut*^{-/-} und Wildttypieren wurde auch für Katalase eine Veränderung in der Expression beobachtet. Sowohl im Skelettmuskel als auch in der Leber der *taut*^{-/-}-Maus ist eine Heraufregulation erkennbar, wobei diese Regulation im Skelettmuskel im Vergleich zur Leber stärker ausgeprägt ist (Abb. 3.14). Katalase ist ein Enzym der antioxidativen Abwehr und katalysiert den Abbau von H₂O₂ zu Wasser und Sauerstoff (SCIBIOR *et al.*, 2006). In der Leber wurde außerdem ein leichter Rückgang der Expression der Glutathionperoxidase (GPx-1) gezeigt (Abb. 3.14). GPx-1 wirkt antioxidativ und ist wie Katalase am Abbau von H₂O₂ beteiligt (WALLACE, 2001). Eine Inaktivierung von GPx-1 steigert die H₂O₂ Produktion und führt zu einem verringerten Atmungskontrollkoeffizienten (ESPOSITO *et al.*, 2000). Auch in den Muskel- und Lebermitochondrien der *taut*^{-/-}-Maus ist dieser Koeffizient deutlich verringert. (WARSKULAT *et al.*, 2006; LÜSEBRINK *et al.*, 2008). Aufgrund der Beobachtung, dass in den *taut*^{-/-}-Mäusen mehr Peroxynitrit entsteht und dass sowohl mtDNA als auch die Atmungskette Veränderungen zeigen, ist anzunehmen, dass die Bildung von ROS in den Mitochondrien dieser Tiere erhöht ist. In der Leber der *taut*^{-/-}-

Mäuse kommt es vermutlich durch eine verminderte Expression von GPx-1 zusätzlich zu einer verstärkten Produktion an H₂O₂. Die Hochregulation der Katalase-Expression ist möglicherweise eine Reaktion darauf. Interessanterweise wurde auch im Zusammenhang mit MELAS eine Hochregulation der Katalase-Expression beobachtet (SANDHU *et al.*, 2005; RUSANEN *et al.*, 2000).

4.5 Ausblick und klinische Relevanz

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen eines Taurinmangels auf Mitochondrien zum ersten Mal im Tiermodell näher charakterisiert. So wurde gezeigt, dass es in den Mitochondrien der Taurintransporter-Knockoutmaus vermehrt zur Bildung von Stickstoff- aber auch Sauerstoffradikalen kommt, was vor allem eine bedeutende Auswirkung auf die Atmungskette zu haben scheint. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass diese Radikale auch an der stärkeren Schädigung der mtDNA in der Skelettmuskulatur von älteren *taut*^{-/-} Mäusen beteiligt sind, was ebenfalls zu schwerwiegenden funktionellen Veränderungen der Atmungskette führt. Punktmutationen an den Positionen 3243 oder 3271 im Gen der mt tRNA^{Leu} sind mit einer mitochondrialen Myopathie, Enzephalopathie, Laktazidose und „stroke-like episodes“ (MELAS) assoziiert (GOTO *et al.*, 1990). Eine Mutation an Position 8344 des mt tRNA^{Lys} Gens wurde in Patienten nachgewiesen, die eine Myklonus-Epilepsie mit „ragged red fibres“ (MERRF) aufweisen (SCHOFFNER *et al.*, 1990). Diese Mutationen sind verantwortlich für eine verschlechterte Translation mitochondrialer Proteine und eine Abnahme der Atmungskettenaktivität (CHOMYN, 1992 & 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass Punktmutationen in mitochondrialen tRNAs in mitochondriale Dysfunktionen involviert sind, die mit MELAS und MERRF in Verbindung gebracht werden (JACOBS *et al.*, 2003; FLORENTZ *et al.*, 2003). Die mutierten tRNAs in MELAS und MERRF haben eine Gemeinsamkeit: allen fehlen Taurin enthaltende Uridine (SUZUKI *et al.*, 2002; YASUKAWA *et al.*, 2000a & 2000b).

Sowohl in der vorliegenden als auch in vorangegangenen Arbeiten wurden Auffälligkeiten an der Taurintransporter-Knockoutmaus identifiziert, die auch bei MELAS und MERRF auftreten: Myopathien, verringerte Aktivität der Atmungskette, u.a. von Komplex IV, Hochregulation von Katalase. Weitere Untersuchungen der mtDNA von *taut*^{-/-} Mäusen, z.B. auf das Vorhandensein von spezifischen Punktmutationen oder mutierten tRNAs könnten weitere Einblicke in den

Zusammenhang zwischen Mitochondriopathien und Taurinmangel geben. Dies ist von großer klinischer Relevanz, da es bis heute noch keine Möglichkeit zur Ursachenbehandlung bei Mitochondriopathien gibt. Die Taurintransporter-Knockoutmaus stellt möglicherweise ein hilfreiches Tiermodell zur Analyse von mitochondrialen Erkrankungen wie MELAS und MERRF dar. Taurin spielt im Organismus eine wichtige Rolle als Osmolyt. Möglicherweise führt der Osmolytmangel in den *taut*^{-/-} Mäusen zu den z.T. schwerwiegenden Veränderungen an den Mitochondrien. Zukünftige Untersuchungen auch an anderen Osmolyttransporter-Knockout-Mäusen könnten weitere Hinweise darauf liefern, wie die Änderung des Osmolythaushalts Einfluss auf die Mitochondrien nimmt, bzw. ob die mitochondrialen Veränderungen auf einen Taurinmangel im speziellen zurückzuführen sind.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines Taurinmangels auf Mitochondrien untersucht. Die Untersuchungen wurden am Modell der Taurintransporter-Knockoutmaus (*taut*^{-/-}) durchgeführt, bei der in vorangegangenen Untersuchungen zahlreiche altersabhängige, auf Grund eines Taurinmangels auftretende, Krankheiten nachgewiesen wurden und sich dabei erste Hinweise auf Veränderungen an den Mitochondrien ergaben.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Methode zum Nachweis mitochondrialer DNA (mtDNA) Mutationen über quantitative Real-time-PCR im Mausmodell etabliert. Im Skelettmuskel von *taut*^{-/-} Mäusen wurde neben einem altersabhängigen Anstieg auch ein 60 %iger Anstieg von Deletionen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet, was darauf hinweist, dass Taurinmangel Einfluss auf die Integrität der mtDNA hat.

Im Herzen der *taut*^{-/-} Mäuse zeigte sich kein Anstieg von mtDNA-Deletionen, was mit vorangegangenen Beobachtungen einer weitgehend normalen Herzfunktion bei *taut*^{-/-} Tieren einhergeht. mRNA-Expressionsanalysen sollten Hinweise auf die im Herzen vorhandenen Kompensationsmechanismen liefern. Überraschenderweise zeigte sich, dass verschiedene bekannte Marker für Hypertonie und kardiale Hypertrophie im *taut*^{-/-} Tier hochreguliert sind. Das weist darauf hin, dass die Tiere, obwohl sie eine weitgehend normale Herzfunktion zeigen, vermutlich unter erhöhtem chronischen Stress anfälliger für Herzversagen sind.

Weiterhin wurde in der Arbeit der Einfluss von Taurinmangel auf die Bildung von reaktiven Stickstoffradikalen (RNS) in Mitochondrien untersucht. Western Blot-Analysen zeigten eine verstärkte Protein-Tyrosin-Nitrierung mitochondrialer Proteine aus Skelettmuskel, Leber und Herz von *taut*^{-/-} Mäusen. In der Leber wurde mit Hilfe einer Immunpräzipitation eine Untereinheit von Komplex I identifiziert, die in *taut*^{-/-} Mäusen stärker nitriert vorliegt. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAF-FM DA wurde zusätzlich gezeigt, dass es in den Mitochondrien aus der Skelettmuskulatur und der Leber von *taut*^{-/-} Tieren zu einer verstärkten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) bzw. Peroxynitrit (ONOO⁻) kommt. Dies ist weder auf eine mitochondriale NO-Synthase noch auf einen Komplex der Atmungskette zurückzuführen. Stattdessen gibt es Hinweise darauf, dass NO-Speicherproteine eine Rolle dabei spielen.

Taurinmangel führt zu zahlreichen, teilweise schweren Veränderungen der Mitochondrien. Dies scheint hauptsächlich auf die vermehrte Bildung von RNS zurückzuführen zu sein. Mehrere der beobachteten Auffälligkeiten in der *taut*^{-/-} Maus werden auch mit den Mitochondriopathien MELAS und MERRF assoziiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die *taut*^{-/-} Maus ein hilfreiches Tiermodell zur Analyse dieser Erkrankungen und Entwicklung von Therapien darstellt.

6 Summary

In this work, the influence of a taurine deficiency on mitochondria was examined. The taurine transporter knockout mouse model (*taut*^{-/-}) was used, because previous works showed several age-depending appearing abnormalities caused by the taurine deficiency and first evidence to alterations of mitochondrial physiology and morphology.

In the first part of this work, an assay for detecting mitochondrial DNA (mtDNA) deletions by quantitative realtime-PCR in the mouse model was established. Besides the age-depending increase in deletions, a taurine deficiency depending increase was observed in mtDNA from skeletal muscle. In this tissue, *taut*^{-/-} animals showed 60 % more deletions of type D13 than control animals. This suggests, that absence of taurine influences the integrity of the mtDNA.

An increase in deletions in the mtDNA was not found in the heart of *taut*^{-/-} mice. This accompanies with the previous observations of a largely normal heart function. mRNA expression analysis should give insights in the compensating mechanisms in the heart of *taut*^{-/-} animals. Surprisingly, several known biomarkers for pressure overload and hypertrophy showed an up regulation, and indicate, that *taut*^{-/-} mice seem to be more susceptible for heart failure under increased chronic stress, although they show a largely normal heart function

In the third part of this work, influences of reactive nitrogen species (RNS) on mitochondria and the respiratory chain were investigated. Western blot analysis showed an increase in protein-tyrosine-nitrated proteins in skeletal muscle, liver and heart of 15-16 month old *taut*^{-/-} mice, while there was no difference in young animals. In the liver a subunit of complex I was identified as one of the nitrated proteins in *taut*^{-/-} animals. Measurements using the fluorescent dye DAF-FM DA showed an increased fluorescence in mitochondria from skeletal muscle and liver of young and old *taut*^{-/-} animals in comparison to control mice, which suggests the augmented formation of nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO⁻) respectively. Formation of reactive nitrogen species was neither NOS- nor respiratory chain-depending. Instead, indication was found, which suggests an involvement of NO-storage proteins.

Taurine deficiency leads to severe changes in mitochondrial physiology and morphology. This seems to be due to an increase in RNS production in the mitochondria. Several of the shown conspicuities in the *taut*^{-/-} mouse are associated with MELAS and MERRF. The results of this work indicate, that the *taut*^{-/-} mouse is a potential and helpful animal model for further investigations and the development of therapeutic strategies of these mitochondriopathies.

7 Literatur

AERTS,L. AND VAN ASSCHE,F.A. (2002). Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. *J. Perinat. Med.* 30, 281-286.

AIHARA,Y., KURABAYASHI,M., SAITO,Y., OHYAMA,Y., TANAKA,T., TAKEDA,S., TOMARU,K., SEKIGUCHI,K., ARAI,M., NAKAMURA,T., AND NAGAI,R. (2000). Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension.* 36, 48-53.

AL-ANI,B., HEWETT,P.W., AHMED,S., CUDMORE,M., FUJISAWA,T., AHMAD,S., AND AHMED,A. (2006). The release of nitric oxide from S-nitrosothiols promotes angiogenesis. *PLoS. ONE.* 1:e25: doi:10.1371/journal.pone0000025

ALBERTS,B., JOHNSON,A., LEWIS,J., RAFF,M., ROBERTS,K., AND WALTER,P. (2002). *Molecular Biology of the Cell.* (New York: Garland Publishing).

ALMEIDA,A., CIDAD,P., GADO-ESTEBAN,M., FERNANDEZ,E., GARCIA-NOGALES,P., AND BOLANOS,J.P. (2005). Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide: its role in glucose metabolism and neuroprotection. *J. Neurosci. Res.* 79, 166-171.

ANAN,R., NAKAGAWA,M., MIYATA,M., HIGUCHI,I., NAKAO,S., SUEHARA,M., OSAME,M., AND TANAKA,H. (1995). Cardiac involvement in mitochondrial diseases. A study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation.* 91, 955-961.

ANDERSON,S., BANKIER,A.T., BARRELL,B.G., DE BRUIJN,M.H., COULSON,A.R., DROUIN,J., EPERON,I.C., NIERLICH,D.P., ROE,B.A., SANGER,F., SCHREIER,P.H., SMITH,A.J., STADEN,R., AND YOUNG,I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290, 457-465.

BECKMANN,J.S., YE,Y.Z., ANDERSON,P.G., CHEN,J., ACCAVITTI,M.A., TARPEY,M.M., AND WHITE,C.R. (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 375, 81-88.

BIBB,M.J., VAN ETEN,R.A., WRIGHT,C.T., WALBERG,M.W., AND CLAYTON,D.A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell.* 26, 167-180.

BISHOP, J.E., RHODES, S., LAURENT, G.J., LOW, R.B., AND STIREWALT, W.S. (1994). Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 28, 1581-1585.

BJERRUM, O.J. AND SCHÄFER-NIELSEN, C. (1986). Gel electrophoresis of protein. In: *Electrophoresis*, M.J.Dunn, ed. (Weinheim: WCH), pp. 315-327.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

BROSSAS, J.Y., BARREAU, E., COURTOIS, Y., AND TRETON, J. (1994). Multiple deletions in mitochondrial DNA are present in senescent mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 654-659.

BROWN, G.C. AND BORUTAITE, V. (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1440-1450.

BURNEY, S., CAULFIELD, J.L., NILES, J.C., WISHNOK, J.S., AND TANNENBAUM, S.R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* 424, 37-49.

BUYUKAFSAR, K., NELLI, S., AND MARTIN, W. (2001). Formation of nitric oxide from nitroxyl anion: role of quinones and ferricytochrome c. *Br. J. Pharmacol.* 132, 165-172.

CASTELLO, P.R., DAVID, P.S., McCLURE, T., CROOK, Z., AND POYTON, R.O. (2006). Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* 3, 277-287.

CERIELLO, A., QUAGLIARO, L., D'AMICO, M., DI, F.C., MARFELLA, R., NAPPO, F., BERRINO, L., ROSSI, F., AND GIUGLIANO, D. (2002). Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes.* 51, 1076-1082.

CHAPONNIER, C. AND GABBIANI, G. (2004). Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J. Pathol.* 204, 386-395.

- CHEN, Y.F.** (2005). Atrial natriuretic peptide in hypoxia. *Peptides*. 26, 1068-1077.
- CHEN, Z., ZHANG, J., AND STAMLER, J.S.** (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 8306-8311.
- CHESNEY, R.W.** (1985). Taurine: its biological role and clinical implications. *Adv. Pediatr.* 32, 1-42.
- CHOMYN, A.** (1998). The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 745-751.
- CHOMYN, A., MARTINUZZI, A., YONEDA, M., DAGA, A., HURKO, O., JOHNS, D., LAI, S.T., NONAKA, I., ANGELINI, C., AND ATTARDI, G.** (1992). MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4221-4225.
- CLARKSON, E., COSTA, C.F., AND MACHESKY, L.M.** (2004). Congenital myopathies: diseases of the actin cytoskeleton. *J. Pathol.* 204, 407-417.
- COLLER, H.A., BODYAK, N.D., AND KHRAPKO, K.** (2002). Frequent intracellular clonal expansions of somatic mtDNA mutations: significance and mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 434-447.
- COUPE, P.J. AND WILLIAM, D.L.H.** (1999). Formation of peroxynitrite from S-nitrosothiols and hydrogen peroxide. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2*. 1057-1058.
- COVER, C., MANSOURI, A., KNIGHT, T.R., BAJT, M.L., LEMASTERS, J.J., PESSAYRE, D., AND JAESCHKE, H.** (2005). Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 879-887.
- CROTEAU, D.L., STIERUM, R.H., AND BOHR, V.A.** (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat. Res.* 434, 137-148.
- DELLA CORTE, L.** (2000). *Taurine 4: Taurine and Excitable Tissues*. (New York: Plenum Press).

DENICOLA,A., FREEMAN,B.A., TRUJILLO,M., AND RADI,R. (1996a). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49-58.

DENICOLA,A., SOUZA,J.M., RADI,R., AND LISSI,E. (1996b). Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 208-212.

DIMAURO,S. AND SCHON,E.A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 2656-2668.

DREW,B. AND LEEUWENBURGH,C. (2002). Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 66-81.

EIMON,P.M., CHUNG,S.S., LEE,C.M., WEINDRUCH,R., AND AIKEN,J.M. (1996). Age-associated mitochondrial DNA deletions in mouse skeletal muscle: comparison of different regions of the mitochondrial genome. *Dev. Genet.* 18, 107-113.

ESPOSITO,L.A., KOKOSZKA,J.E., WAYMIRE,K.G., COTTRELL,B., MACGREGOR,G.R., AND WALLACE,D.C. (2000). Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 754-766.

FLORENTZ,C., SOHM,B., TRYOEN-TOTH,P., PUTZ,J., AND SISSLER,M. (2003). Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1356-1375.

GHAFOURIFAR,P. AND RICHTER,C. (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418, 291-296.

GHAFOURIFAR,P. AND SEN,C.K. (2007). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Front Biosci.* 12, 1072-1078.

GOGVADZE,V., ROBERTSON,J.D., ENOKSSON,M., ZHIVOTOVSKY,B., AND ORRENIUS,S. (2004). Mitochondrial cytochrome c release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition. *Biochem. J.* 378, 213-217.

GOTO,Y., NONAKA,I., AND HORAI,S. (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 348, 651-653.

- GREENACRE,S.A. AND ISCHIROPOULOS,H.** (2001). Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic. Res.* *34*, 541-581.
- GREENE,J.G., PORTER,R.H., ELLER,R.V., AND GREENAMYRE,J.T.** (1993). Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J. Neurochem.* *61*, 1151-1154.
- HARMAN,D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* *11*, 298-300.
- HARMAN,D.** (2006). Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1067*, 10-21.
- HÄUSSINGER,D. AND LANG,F.** (1990). Exposure of perfused liver to hypotonic conditions modifies cellular nitrogen metabolism. *J. Cell. Biochem.* *43*, 355-361.
- HAYES,K.C. AND TRAUTWEIN,E.A.** (1989). Taurine deficiency syndrome in cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* *19*, 403-413.
- HAYES,K.C., CAREY,R.E., AND SCHMIDT,S.Y.** (1975). Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science.* *188*, 949-951.
- HELLER-STILB,B., VAN,R.C., RASCHER,K., HARTWIG,H.G., HUTH,A., SEELIGER,M.W., WARSKULAT,U., AND HÄUSSINGER,D.** (2002). Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J.* *16*, 231-233.
- HENRICH,M., PADDENBERG,R., HABERBERGER,R.V., SCHOLZ,A., GRUSS,M., HEMPELMANN,G., AND KUMMER,W.** (2004). Hypoxic increase in nitric oxide generation of rat sensory neurons requires activation of mitochondrial complex II and voltage-gated calcium channels. *Neuroscience.* *128*, 337-345.
- HEWETT,T.E., GRUPP,I.L., GRUPP,G., AND ROBBINS,J.** (1994). Alpha-skeletal actin is associated with increased contractility in the mouse heart. *Circ. Res.* *74*, 740-746.
- HOLLOSZY,J.O., OSCAL,L.B., DON,I.J., AND MOLE,P.A.** (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *40*, 1368-1373.

HOOD,D.A., ZAK,R., AND PETTE,D. (1989). Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome-c-oxidase subunits. *Eur. J. Biochem.* 179, 275-280.

HUXTABLE,R.J. (1986). *The Biochemistry of Sulfur.* (New York: Plenum Press).

HUXTABLE,R.J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101-163.

ISCHIROPOULOS,H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 1-11.

JACOBS,H.T. (2003). Disorders of mitochondrial protein synthesis. *Hum. Mol. Genet.* Epub: 2003 Aug. 19., 12 *Spec No 2*: R293-R301.

JUKES,T.H. AND OSAWA,S. (1990). The genetic code in mitochondria and chloroplasts. *Experientia.* 46, 1117-1126.

KADOWAKI,T., KADOWAKI,H., MORI,Y., TOBE,K., SAKUTA,R., SUZUKI,Y., TANABE,Y., SAKURA,H., AWATA,T., AND GOTO,Y. (1994). A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 330, 962-968.

KASHIWAGI,S., KAJIMURA,M., YOSHIMURA,Y., AND SUEMATSU,M. (2002). Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography. *Circ. Res.* 91, e55-e64.

KISSNER,R., NAUSER,T., BUGNON,P., LYE,P.G., AND KOPPENOL,W.H. (1997). Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1285-1292.

KOJIMA,H., URANO,Y., KIKUCHI,K., HIGUCHI,T., HIRATA,Y., AND NAGANO,T. (1999). Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 3209-3212.

KOZLOV,A.V., STANIEK,K., AND NOHL,H. (1999). Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 454, 127-130.

KUZNETSOV, A. V., LASSNIG, B., AND GNAIGER, E. (2005). Citrate Synthase - Mitochondrial Marker Enzyme. *Mitochondrial Physiology Network* 8.14, 1-8.

KRISHNAN,K.J., GREAVES,L.C., REEVE,A.K., AND TURNBULL,D.M. (2007). Mitochondrial DNA mutations and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1100*, 227-240.

KYHSE-ANDERSEN,J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* *10*, 203-209.

LACZA,Z., SNIPES,J.A., ZHANG,J., HORVATH,E.M., FIGUEROA,J.P., SZABO,C., AND BUSIJA,D.W. (2003). Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic. Biol. Med.* *35*, 1217-1228.

LACZA,Z., HORN,T.F., SNIPES,J.A., ZHANG,J., ROYCHOWDHURY,S., HORVATH,E.M., FIGUEROA,J.P., KOLLAI,M., SZABO,C., AND BUSIJA,D.W. (2004). Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. *J. Neurochem.* *90*, 942-951.

LACZA,Z., HORVATH,E.M., PANKOTAI,E., CSORDAS,A., KOLLAI,M., SZABO,C., AND BUSIJA,D.W. (2005). The novel red-fluorescent probe DAR-4M measures reactive nitrogen species rather than NO. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* *52*, 335-340.

LACZA,Z., KOZLOV,A.V., PANKOTAI,E., CSORDAS,A., WOLF,G., REDL,H., KOLLAI,M., SZABO,C., BUSIJA,D.W., AND HORN,T.F. (2006). Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway. *Free Radic. Res.* *40*, 369-378.

LAEMMLI,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* *227*, 680-685.

LANG,F. (2007). Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J. Am. Coll. Nutr.* *26*, 613S-623S.

LAUZIER,B., SICARD,P., BOUCHOT,O., DELEMASURE,S., MOREAU,D., VERGELY,C., AND ROCHETTE,L. (2007). A peroxynitrite decomposition catalyst: FeTPPS confers cardioprotection during reperfusion after cardioplegic arrest in a working isolated rat heart model. *Fundam. Clin. Pharmacol.* *21*, 173-180.

LEPILLER,S., LAURENS,V., BOUCHOT,A., HERBOMEL,P., SOLARY,E., AND CHLUBA,J. (2007). Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diamino-fluorescein probe. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 619-627.

LILL,R. AND MUHLENHOFF,U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 457-486.

LOPEZ,B., GONZALEZ,A., VARO,N., LAVIADES,C., QUEREJETA,R., AND DIEZ,J. (2001). Biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Hypertension.* 38, 1222-1226.

LORENZ,P., ROYCHOWDHURY,S., ENGELMANN,M., WOLF,G., AND HORN,T.F. (2003). Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide.* 9, 64-76.

LÜSEBRINK, J., WARSKULAT, U., SCHRÖDER, P., SOBOLL, S., DIENES, H. P., AND HÄUSSINGER, D. (2008) Taurine depletion influences integrity of mitochondrial genome in mouse skeletal muscle. *Cell. Physiol. Biochem.*, zur Publikation eingereicht, in Revision.

MATSUNO-YAGI,A. AND HATEFI,Y. (2001). Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (complex III). Effect of inhibitors on cytochrome b reduction in submitochondrial particles and the role of ubiquinone in complex III. *J. Biol. Chem.* 276, 19006-19011.

MCBRIDE,H.M., NEUSPIEL,M., AND WASIAK,S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16, R551-R560.

MCGUIRE,J.J., ANDERSON,D.J., McDONALD,B.J., NARAYANASAMI,R., AND BENNETT,B.M. (1998). Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate. *Biochem. Pharmacol.* 56, 881-893.

McHUGH,K.M., CRAWFORD,K., AND LESSARD,J.L. (1991). A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. *Dev. Biol.* 148, 442-458.

NISHIKAWA,T. AND ARAKI,E. (2007). Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid. Redox. Signal.* 9, 343-353.

- NISHIKIMI,T., MAEDA,N., AND MATSUOKA,H.** (2006). The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 69, 318-328.
- NOHL,H., STANIEK,K., SOBHIAN,B., BAHRAMI,S., REDL,H., AND KOZLOV,A.V.** (2000). Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. *Acta Biochim. Pol.* 47, 913-921.
- OZAWA,T.** (1999). Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 377-390.
- PALACINO,J.J., SAGI,D., GOLDBERG,M.S., KRAUSS,S., MOTZ,C., WACKER,M., KLOSE,J., AND SHEN,J.** (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279, 18614-18622.
- PIEPER,G.M. AND SIEBENEICH,W.** (1997). Use of a nitronyl nitroxide to discriminate the contribution of nitric oxide radical in endothelium-dependent relaxation of control and diabetic blood vessels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 138-147.
- QI,K., QIU,H., RUTHERFORD,J., ZHAO,Y., NANCE,D.M., AND ORR,F.W.** (2004). Direct visualization of nitric oxide release by liver cells after the arrest of metastatic tumor cells in the hepatic microvasculature. *J. Surg. Res.* 119, 29-35.
- RADI,R., CASSINA,A., AND HODARA,R.** (2002a). Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* 383, 401-409.
- RADI,R., CASSINA,A., HODARA,R., QUIJANO,C., AND CASTRO,L.** (2002b). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1451-1464.
- RASCHER,K., SERVOS,G., BERTHOLD,G., HARTWIG,H.G., WARSKULAT,U., HELLERSTILB,B., AND HÄUSSINGER,D.** (2004). Light deprivation slows but does not prevent the loss of photoreceptors in taurine transporter knockout mice. *Vision Res.* 44, 2091-2100.
- REDDY,V.P., BEYAZ,A., PERRY,G., COOKE,M.S., SAYRE,L.M., AND SMITH,M.A.** (2007). The Role of Oxidative Damage to Nucleic Acids in the Pathogenesis of Neurological Disease. In: *Oxidative Damage to Nucleic Acids*, M.D.Evans and M.S.Cooke, eds. Springer Verlag).

REERS,M., SMITH,T.W., AND CHEN,L.B. (1991). J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*. 30, 4480-4486.

RUBATTU,S. AND VOLPE,M. (2001). The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J. Hypertens*. 19, 1923-1931.

RUSANEN,H., MAJAMAA,K., AND HASSINEN,I.E. (2000). Increased activities of antioxidant enzymes and decreased ATP concentration in cultured myoblasts with the 3243A-->G mutation in mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta*. 1500, 10-16.

SAMBROOK,J., FRITSCH,E.F., AND MANIATIS,T. (2001). Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis. In *Molecular Cloning, 3rd Edition*, (New York: Spring Harbour Laboratory Press).

SANDHU,J.K., SODJA,C., McRAE,K., LI,Y., RIPPSTEIN,P., WEI,Y.H., LACH,B., LEE,F., BUCURESCU,S., HARPER,M.E., AND SIKORSKA,M. (2005). Effects of nitric oxide donors on cybrids harbouring the mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) A3243G mitochondrial DNA mutation. *Biochem. J*. 391, 191-202.

SATSU,H., TERASAWA,E., HOSOKAWA,Y., AND SHIMIZU,M. (2003). Functional characterization and regulation of the taurine transporter and cysteine dioxygenase in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Biochem. J*. 375, 441-447.

SCHILD,L., REINHECKEL,T., REISER,M., HORN,T.F., WOLF,G., AND AUGUSTIN,W. (2003). Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. *FASEB J*. 17, 2194-2201.

SCHLEICHER,E. AND FRIESS,U. (2007). Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int. Suppl*. 106, S17-S26.

SCHLIESS,F., FOSTER,N., GÖRG,B., REINEHR,R., AND HÄUSSINGER,D. (2004). Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia*. 47, 21-29.

- SCHON,E.A., RIZZUTO,R., MORAES,C.T., NAKASE,H., ZEVIANI,M., AND DIMAURO,S.** (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*. *244*, 346-349.
- SCIBIOR,D. AND CZECZOT,H.** (2006). Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. *60*, 170-180.
- SHIGENAGA,M.K., HAGEN,T.M., AND AMES,B.N.** (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *91*, 10771-10778.
- SHOFFNER,J.M., LOTT,M.T., LEZZA,A.M., SEIBEL,P., BALLINGER,S.W., AND WALLACE,D.C.** (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*. *61*, 931-937.
- SHOFFNER,J.M., LOTT,M.T., VOLJAVEC,A.S., SOUEIDAN,S.A., COSTIGAN,D.A., AND WALLACE,D.C.** (1989). Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *86*, 7952-7956.
- SMITH,A.L.** (1967). Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material, small-scale. *Methods in Enzymology* *10*, 81-86.
- SMITH,K.E., BORDEN,L.A., WANG,C.H., HARTIG,P.R., BRANCHEK,T.A., AND WEINSHANK,R.L.** (1992). Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol. Pharmacol.* *42*, 563-569.
- SRERE, P. A., BRAZIL, H., AND GONEN** (1963) *L. Acta Chem.Scand.* *17*, 129-134.
- SRIVASTAVA,S. AND MORAES,C.T.** (2005). Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 893-902.
- STEFFEN,M., SARKELA,T.M., GYBINA,A.A., STEELE,T.W., TRASSETH,N.J., KUEHL,D., AND GIULIVI,C.** (2001). Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem. J.* *356*, 395-402.
- SUN,F., HUO,X., ZHAI,Y., WANG,A., XU,J., SU,D., BARTLAM,M., AND RAO,Z.** (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. *121*, 1043-1057.

SUN,Y. AND WEBER,K.T. (1996). Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28, 851-858.

SUZUKI,T., SUZUKI,T., WADA,T., SAIGO,K., AND WATANABE,K. (2002). Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* 21, 6581-6589.

TANHÄUSER,S.M. AND LAIPIS,P.J. (1995). Multiple deletions are detectable in mitochondrial DNA of aging mice. *J Biol. Chem.* 270, 24769-24775.

TAY,Y.M., LIM,K.S., SHEU,F.S., JENNER,A., WHITEMAN,M., WONG,K.P., AND HALLIWELL,B. (2004). Do mitochondria make nitric oxide? No? *Free Radic. Res.* 38, 591-599.

TRIFUNOVIC,A., WREDENBERG,A., FALKENBERG,M., SPELBRINK,J.N., ROVIO,A.T., BRUDER,C.E., BOHLOOLY,Y., GIDLOF,S., OLDFORS,A., WIBOM,R., TORNELL,J., JACOBS,H.T., AND LARSSON,N.G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature.* 429, 417-423.

TURKO,I.V. AND MURAD,F. (2002). Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Rev.* 54, 619-634.

TURKO,I.V., LI,L., AULAK,K.S., STUEHR,D.J., CHANG,J.Y., AND MURAD,F. (2003). Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J. Biol. Chem.* 278, 33972-33977.

TYYNISMAA,H., MJOSUND,K.P., WANROOIJ,S., LAPPALAINEN,I., YLIKALLIO,E., JALANKO,A., SPELBRINK,J.N., PAETAU,A., AND SUOMALAINEN,A. (2005). Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 17687-17692.

VANDEKERCKHOVE,J. AND WEBER,K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126, 783-802.

- VANDEKERCKHOVE,J., BUGAISKY,G., AND BUCKINGHAM,M.** (1986). Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J. Biol. Chem.* 261, 1838-1843.
- VINNAKOTA,S., QIAN,X., EGAL,H., SARTHY,V., AND SARKAR,H.K.** (1997). Molecular characterization and in situ localization of a mouse retinal taurine transporter. *J. Neurochem.* 69, 2238-2250.
- WALLACE, D.C.** (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283, 1482-1488.
- WALLACE, D.C.** (2001). Mitochondrial genes in degenerative disease and aging. *The Scientific World* 1, 83-84.
- WARSKULAT,U., FLÖGEL,U., JACOBY,C., HARTWIG,H.G., THEWISSEN,M., MERX,M.W., MOLOJAVYI,A., HELLER-STILB,B., SCHRADER,J., AND HÄUSSINGER,D.** (2004). Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J.* 18, 577-579.
- WARSKULAT,U., ANDREE,B., LÜSEBRINK,J., KÖHRER,K., AND HÄUSSINGER,D.** (2006a). Switch from actin alpha1 to alpha2 expression and upregulation of biomarkers for pressure overload and cardiac hypertrophy in taurine-deficient mouse heart. *Biol. Chem.* 387, 1449-1454.
- WARSKULAT,U., BORSCH,E., REINEHR,R., HELLER-STILB,B., MÖNNIGHOFF,I., BUCHCZYK,D., DONNER,M., FLÖGEL,U., KAPPERT,G., SOBOLL,S., BEER,S., PFEFFER,K., MARSCHALL,H.U., GABRIELSEN,M., AMIRY-MOGHADDAM,M., OTTERSEN,O.P., DIENES,H.P., AND HÄUSSINGER,D.** (2006b). Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *FASEB J.* 20, 574-576.
- WARSKULAT,U., BORSCH,E., REINEHR,R., HELLER-STILB,B., ROTH,C., WITT,M., AND HÄUSSINGER,D.** (2007). Taurine deficiency and apoptosis: findings from the taurine transporter knockout mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 202-209.

WATABE,M. AND NAKAKI,T. (2007). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-elicited dopamine redistribution from vesicles to cytosol in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**, 499-507.

WIESNER,R.J., RUEGG,J.C., AND MORANO,I. (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 553-559.

WILLIAMS,R.S., SALMONS,S., NEWSHOLME,E.A., KAUFMAN,R.E., AND MELLOR,J. (1986). Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **261**, 376-380.

WOJTCZAK,L., ZALUSKA,H., WRONISZEWSKA,A., AND WOJTCZAK,A.B. (1972). Assay for the intactness of the outer membrane in isolated mitochondria. *Acta Biochim. Pol.* **19**, 227-234.

WOODS,R.L. (2004). Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 791-794.

YASUKAWA,T., SUZUKI,T., ISHII,N., UEDA,T., OHTA,S., AND WATANABE,K. (2000a). Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett.* **467**, 175-178.

YASUKAWA,T., SUZUKI,T., UEDA,T., OHTA,S., AND WATANABE,K. (2000b). Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J. Biol. Chem.* **275**, 4251-4257.

ZHANG,X., HAN,D., DING,D., DAI,P., YANG,W., JIANG,S., AND SALVI,R.J. (2002). Cochlear mitochondrial DNA3867bp deletion in aged mice. *Chin. Med. J. (Engl.)*. **115**, 1390-1393.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ANF | atrialer natriuretischer Faktor |
| BNP | <i>brain natriuretic protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CARP | <i>cardiac ankyrin repeat protein</i> |
| cDNA | <i>copy</i> -DNA |
| CoQ | Coenzym Q ₁₀ |
| COX | Cytochrom c Oxidase |
| CPTIO | 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-Tetramethylimidazolin-1-Oxyl-3-Oxid |
| Cyt c | Cytochrom c |
| D1, D3, D13 | Deletion 1, 3, 13 |
| DAF-FM DA | 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoreszeindiacetat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FeTPPS | 5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)prophyrinato Eisen (III) |
| g, kg, mg, µg, ng | Gramm, Kilo-, Milli-, Mikro-, Nanogramm |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GPx | Glutathion Peroxidase |
| h, min, sek | Stunde, Minute, Sekunde |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase |
| KCN | Kaliumzyanid |
| kDa | Kilodalton |
| l, ml, µl | Liter, Milli-, Mikroliter |
| L-NMMA | N-Methyl-L-Arginin |
| M, mM, µM, nM, pM | Molar, Milli-, Mikro-, Nano-, Picomolar |
| mA | Milliampere |

| | |
|-------------------|---|
| MELAS | Myopathie, Enzephalopathie, Laktazidose und <i>stroke-like episodes</i> |
| MERRF | Myoklonus Epilepsie mit <i>ragged-red fibres</i> |
| MI-Puffer | Mitochondrienisolationspuffer |
| MnSOD | Mangan-Superoxiddismutase |
| mt | mitochondrial |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADH-DHG | NADH-Dehydrogenase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| ONOO ⁻ | Peroxynitrit |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | <i>phosphat buffered saline</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PTN | Protein-Tyrosin-Nitrierung |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNS | reaktive Stickstoffspezies |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| SDH | Succinat-Dehydrogenase |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SNOC | S-Nitrocystein |
| SSC | <i>saline sodium citrat</i> |
| TAUT | Taurintransporter |
| TBST | <i>Tris buffered saline</i> mit Tween |
| U | <i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität |
| ün | über Nacht |
| V | Volt |
| v.a. | vor allem |
| w/v | <i>weight per volume</i> |
| z.B. | zum Beispiel |

9 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Ulrich Warskulat für die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken, für die Geduld bei der Beantwortung aller Fragen und die Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. Frank Wunderlich bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger danke ich für die Überlassung des Themas und dass ich dieses in seiner Arbeitsgruppe im Rahmen des Graduiertenkollegs 1033 – „Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention“ bearbeiten durfte.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Gewährung ihrer großzügigen finanziellen Unterstützung im Rahmen des Stipendiums.

Bei Herrn Dr. Boris Görg möchte mich herzlich für die wissenschaftliche Betreuung, die fruchtbare Zusammenarbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Frau Dr. Birgit Andrée danke ich für die Durchführung der DNA-Mikroarray-Analyse.

Allen meinen Kollegen aus dem Forschungslabor danke ich für die Hilfsbereitschaft und nette Arbeitsatmosphäre. Ohne Euch wäre die Zeit nur halb so schön gewesen.

Meinen Kolleginnen aus dem Graduiertenkolleg, Verena Schildgen und Tanja Maresch, danke ich für viele zusammen verbrachte Praktika, Tagungen und Abende, und ihre Diskussionsbereitschaft wissenschaftlicher aber auch privater Natur.

Meinen Freundinnen Regina Schroetel, Nadine Tillmanns, Linda Bunzenthal, Sabine Heiligtag und Lisa Richter danke ich dafür, dass sie mir während der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und auch mal aufbauende Worte bereit hatten, wenn sie nötig waren.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinem Freund Ralf Heinecke, die auf ihre Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den