

Institut für Ernährungswissenschaften
Fachbereich 09 – Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement

Professur für Immunologie
Fachbereich 08 – Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Bioenergetische Messungen in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)

-

Einfluss von Alter, Geschlecht und zirkadianem Rhythmus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt von

Ernährungswissenschaftlerin (M.Sc.)

Carmina Viktoria Silaidos

Gießen 2020

1. Gutachter: Prof. Dr. Gunter P. Eckert
 2. Gutachter: Prof. Dr. Michael U. Martin
- Tag der Disputation: 25.06.2020

I. Inhaltsverzeichnis

II.	Abbildungsverzeichnis.....	VIII
III.	Tabellenverzeichnis.....	X
IV.	Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1	Einleitung.....	1
1.1	Alterung und Neurodegeneration.....	1
1.1.1	Alterung des Gehirns.....	2
1.1.2	Alzheimer Erkrankung.....	5
1.2	Mitochondriale Funktion als Schlüsselfaktor bei der Alterung und AD.....	12
1.2.1	Aufbau und Funktion der Mitochondrien.....	12
1.2.2	Rolle der mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und AD.....	15
1.2.3	Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion.....	19
1.3	Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) zur Untersuchung der Bioenergetik im Menschen.....	23
1.3.1	Zusammenhang zwischen der Bioenergetik im Gehirn und PBMCs.....	23
1.3.2	Zellen des peripheren Blutes.....	25
1.3.3	Einflussfaktoren auf bioenergetische Messungen in PBMCs.....	30
1.4	Prävention der Gehirnalterung und Neurodegeneration.....	32
1.4.1	Mediterrane Diät.....	33
1.4.2	Körperliche Aktivität.....	34
1.4.3	Kognitives Training.....	35
1.4.4	Multimodale Ansätze zur Prävention.....	36
2	Zielsetzung.....	39
3	Material und Methoden.....	41
3.1	Materialien.....	41
3.1.1	Geräte.....	41
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	42
3.1.3	Chemikalien.....	43
3.1.4	Kits.....	45
3.1.5	Puffer, Lösungen und Medien.....	45
3.1.6	Primer für die quantitative real-time PCR.....	47
3.2	Methoden.....	48
3.2.1	Konzeption der klinischen Studien.....	48
3.2.2	Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen.....	59
3.2.3	Durchflusszytometrie.....	60
3.2.4	Messung der ATP-Konzentration.....	61

3.2.5	Respiratorische Messungen (Oxygraph-2k).....	61
3.2.6	Quantitative real-time PCR.....	63
3.2.7	Messung der Citratsynthase (CS)-Aktivität.....	65
3.2.8	Bestimmung der Chronotypen	66
3.2.9	Messung der Melatoninspiegel	66
3.2.10	Magnet Resonanz Spektroskopie (MRS) Protokoll.....	66
3.2.11	Bestimmung verschiedener Blutparameter	67
3.2.12	Bestimmung des Omega-3-Indexes.....	67
3.2.13	Statistische Auswertung	67
4	Ergebnisse.....	68
4.1	Etablierungsversuche	68
4.1.1	Vergleich zweier Zentrifugenröhrchen zur Isolation von PBMCs.....	68
4.1.2	Einfluss von Melatonin auf die Messung der mitochondrialen Funktion	72
4.2	Untersuchung der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn.....	78
4.2.1	Studie 1: Etablierung von Biomarkern zur Erfassung des peripheren und zerebralen Energiemetabolismus (PECEME)	78
4.2.2	Studie 2: Etablierung von Biomarkern zur Erfassung des peripheren und zerebralen Energiemetabolismus im Alter (PECEMA-Studie).....	84
4.2.3	Studie 3: Multimodale Strategien zur Prävention der Alzheimer Erkrankung (MIND ADmini-Studie)	86
4.3	Geschlechts- und altersassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion	97
4.3.1	Zusammenfassung der geschlechtsassoziierten Unterschiede der mitochondrialen Funktion der verschiedenen Studien.....	97
4.3.2	Zusammenfassung der altersassoziierten Unterschiede der mitochondrialen Funktion in den verschiedenen Studien	102
5	Diskussion	106
5.1	Isolation von PBMCs und anschließende bioenergetische Messungen	106
5.1.1	Vergleich zweier Zentrifugenröhrchen zur Isolation von PBMCs.....	106
5.1.2	Einfluss von Melatonin auf mitochondriale Parameter	109
5.2	Untersuchung der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn.....	112
5.2.1	Korrelation der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn	112
5.2.2	Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn	113
5.2.3	Altersassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs.....	119
5.3	Einfluss einer sechsmonatigen multimodalen Intervention auf metabolische Parameter und die mitochondriale Funktion in PBMCs	125
5.3.1	Einfluss der Intervention auf anthropometrische und metabolische Parameter	126

5.3.2	Einfluss der Intervention auf die Fettsäurezusammensetzung und den Omega-3-Index 129	
5.3.3	Einfluss der Intervention auf mitochondriale Parameter	130
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	137
6	Zusammenfassung.....	139
7	Summary	142
8	Literaturverzeichnis.....	144
	Anhang	169
	Danksagung.....	171
	Veröffentlichte Original- und Übersichtsarbeiten	173
	Erklärung	174

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Zelluläre Kennzeichen für die Alterung.	2
Abbildung 1.2 Die APP-Prozessierung - Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg (modifiziert nach (Picone et al. 2014)).	6
Abbildung 1.3 Einflussfaktoren und Ursachen der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung.	8
Abbildung 1.4 Aufbau und Rolles des Mitochondriums im Energiemetabolismus.	13
Abbildung 1.5 Rolle der Mitochondrien bei der Alterung und AD.	16
Abbildung 1.6 Veränderungen des Energiemetabolismus bei Frauen im Alterungsprozess (modifiziert nach Lejri et al. 2018).	21
Abbildung 1.7 Einfluss von Estrogen auf die mitochondriale Funktion in den meisten Geweben (modifiziert nach Lejri et al. 2018; Ventura-Clapier et al. 2017).	22
Abbildung 1.8 Hämatopoese im Knochenmark (modifiziert nach Murphy & Weaver 2018).	27
Abbildung 1.9 Energetische Profile der unterschiedlichen Blutzellen.	29
Abbildung 1.10 Melatoninproduktion in Frauen und Männern (modifiziert nach Gunn et al. 2016; Santhi et al. 2016).	31
Abbildung 3.1 Studiendesign der Studie Falcon vs. Leucosep™.	49
Abbildung 3.2 Studiendesign Melatonin-Studie.	50
Abbildung 3.3 Studiendesign PECEME-Studie.	52
Abbildung 3.4 Studiendesign PECEMA-Studie.	54
Abbildung 3.5 Studiendesign MIND AD _{MINI} -Studie.	57
Abbildung 3.6 Isolationsprozess PBMCs.	59
Abbildung 3.7 Beispiel einer respiratorischen Messung (Oxygraph-2k) mit isolierten PBMCs.	63
Abbildung 4.1 Zellanzahl nach der Isolation mit unterschiedlichen Zentrifugenröhrchen.	68
Abbildung 4.2 Zusammensetzung der PBMCs nach der Isolation mit A Falcon und B Leucosep™ Zentrifugenröhrchen.	69
Abbildung 4.3 Prozentuale Anteile der einzelnen Zellpopulation der isolierten PBMCs.	70
Abbildung 4.4 Einfluss der verschiedenen Zentrifugationsröhrchen auf die mitochondriale Funktion.	70
Abbildung 4.5 Chronotypen von weiblichen und männlichen Probanden.	72
Abbildung 4.6 Melatonin- Konzentration der A weiblichen und B männlichen Probanden um 8 und 14 Uhr.	73
Abbildung 4.7 Einfluss des Melatonins auf die mitochondriale Respiration.	75
Abbildung 4.8 Zellzahl normalisierte ATP-Spiegel in isolierten PBMCs von A weiblichen und B männlichen Probanden.	76
Abbildung 4.9 Korrelationen.	79
Abbildung 4.10 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in mitochondrialen Parametern in PBMCs.	81
Abbildung 4.11 NAA Konzentrationen in den A graue Substanz (GM) und B weißer Substanz (WM) Regionen in weiblichen und männlichen Probanden.	82
Abbildung 4.12 mRNA-Expression von Genen der mitochondrialen Biogenese.	83
Abbildung 4.13 mRNA Expression von Gene der antioxidativen Abwehr.	83
Abbildung 4.14 Altersassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs.	85
Abbildung 4.15 Anthropometrische Daten.	87
Abbildung 4.16 Ergebnisse der Bestimmung der Blutparameter.	89
Abbildung 4.17 Ergebnisse der Bestimmung des Fettsäureprofils in Erythrozyten.	90

Abbildung 4.18 Ergebnisse der Bestimmung des HS- Omega-3 Index in Erythrozyten.	91
Abbildung 4.19 Ergebnisse der Untersuchungen der mitochondrialen Funktion beim <i>Visit 1</i>	92
Abbildung 4.20 Einfluss der sechsmonatigen Intervention auf die mitochondriale Funktion.....	93
Abbildung 4.21 Einfluss der sechsmonatigen Intervention auf die mitochondriale Funktion bei Frauen.	95
Abbildung 4.22 Einfluss der sechsmonatigen Intervention auf die mitochondriale Funktion bei Männern.....	96
Abbildung 4.23 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs von jungen Probanden.	98
Abbildung 4.24 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs von MCI-Patienten.	99
Abbildung 4.25 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs von jungen und alten Probanden.....	101
Abbildung 4.26 Vergleich der mitochondriale Funktion in PBMCs von jungen, alten Probanden und Probanden mit MCI.	103

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Falcon vs. LeucosepTM - Demographische Daten.	49
Tabelle 3.2 Melatonin-Studie - Demographische Daten.	51
Tabelle 3.3 Melatonin-Studie - Hämatologie.	51
Tabelle 3.4 PECEME-Studie - Demographische Daten.	53
Tabelle 3.5 PECEMA-Studie - Demographische Daten.	55
Tabelle 3.6 PECEMA-Studie - Hämatologie.	55
Tabelle 3.7 MIND AD _{mini} -Studie - Demographische Daten (Visit 1).	58
Tabelle 3.8 MIND AD _{mini} -Studie - Hämatologie (Visit 1).	58
Tabelle 3.9 Zellarten und CD-Expressionen der FACS-Analyse.....	61
Tabelle 3.10 Zyklusbedingungen für die qRT-PCR.	64
Tabelle 4.1 Vergleich Falcon vs. LeucosepTM - Mitochondriale Komplexaktivität in isolierten PBMCs.	71
Tabelle 4.2 Melatonin-Studie - Mitochondriale Komplexaktivität in isolierten PBMCs.....	77
Tabelle 4.3 Korrelationen.	80
Tabelle 4.4 PECEME-Studie - Mitochondriale Komplexaktivität in isolierten PBMCs.	82
Tabelle 4.5 mRNA-Expression.....	84
Tabelle 4.6 PECEMA-Studie - Mitochondriale Komplexaktivität.	86
Tabelle 4.7 Melatoninstudie – Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.....	100
Tabelle 4.8 MIND AD _{mini} -Studie – Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.....	100
Tabelle 4.9 PECEMA-Studie – Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.....	102
Tabelle 4.10 Altersassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.	105
Tabelle A1 Hämatologie MIND AD _{mini} -Studie.	169
Tabelle A2 MIND AD _{mini} -Studie-Mitochondriale Komplexaktivität.....	170

IV. Abkürzungsverzeichnis

¹H-MRS *Protonen-Magnetresonanzspektroskopie*

³¹P-MRS *Phosphor-Magnetresonanzspektroskopie*
3T *3 Tesla*

A+T *Ascorbat+TMPD*

ACC *Acceleration*

ACID *Amyloid precursor proteinintrazelluläre Domäne*

ACTB *Beta-Actin*

AD *Alzheimer Erkrankung*

ADAMS *Aging Demographics and Memory Study*

ADP *Adenosindiphosphat, Siehe*

AMP *Adenosinmonophosphat*

AMPK *Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase*

APOE- ϵ_4 *Apolipoprotein E*

APP *Amyloid Precursor protein*

ATP5D *ATP synthase F1 subunit delta*

A β *Amyloid β*

BDNF *brain-derived neurotrophic factor*

BMI *Body Mass Index*

BSA *Bovines Serumalbumin*

CAT *Katalase*

CD *Cluster of differentiation*

CERAD *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

COA-SH *Coenzym A*

COX5A *Cytochrome c oxidase subunit 5a*

Cr *Kreatin*

CREB1 *cAMP response element binding Protein 1*

CRP *C-reaktives Protein*

CS *Citratsynthase*

CSF *Cerebrale Flüssigkeit*

CTF *C-terminales Fragment*

CTL *cytotoxischer T-Lymphozyt*

Da *Dalton*

DEC *Deceleration*

DGZ *Dichtegradzentrifugation*

Dig *Digitonin*

DLMO *Dim light melatonin onset*

DNA: *Desoxyribonukleinsäure*

DPBS *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

Drp1 *dynamamin-related Protein*

DSM-IV *Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders*

DTNB *5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure*

E2 *Estrogen*
 EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*
 ER *Estrogenrezeptor*
 ETS *Elektronentransportsystem*

FAD *familiäre Alzheimer Erkrankung*
 FADH₂ *Flavin-Adenin-Dinukleotid*
 FCCP *Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*
 FCS *Fetales Kälberserum*
 FINGER *Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability*
 Fis1 *Mitochondrial fission 1*

G+M *Glutamat und Malat*
 GAPDH *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*
 GPx *Glutathionperoxidase*
 GSH *Glutathion*
 GSSG *Glutathiondisulfid*

HCT *Hämatokrit*
 HDL *high density lipoprotein*
 HEPES *2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure*
 HGB *Hämoglobin*
 HSCs *hämatopoetische Stammzellen*

IGF *Insulin-like growth factor*

K *Komplex*
 Ko *Kontrolle*

L&F *Lifesytle&Food*
 LDL *low density lipoprotein*
 LOAD *late-onset Alzheimer disease*
 Ls *Lifestyle*
 LYM *Lymphozyten*

MAPT *Multidomain Alzheimer Prevention Trial*
 MCH *mittleres korpuskulärer Hämoglobingehalt*
 MCHC *Mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration*
 MCI *Mild cognitive impairments*
 MCTQ *Munich ChronoType Questionnaire*
 MCV *mittleres korpuskuläres Volumen*
 MD *Mitochondriale Dysfunktion*
 MeDi *mediterrane Diät*
 Mfn1/2 *Mitofusin 1 und 2 Protein*
 MIND AD *Multimodale Alzheimer Erkrankung Präventionsstudie*
 MiR05 *mitochondrial respiration media 05*
 MMP *mitochondriales Membranpotential*
 MMST *Mini Mental Status Test*
 mPTP *mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore*
 mRNA *messenger RNA*

MRS *Magnetresonanzspektroskopie*
MRT: *Magnetresonanztomographie*
mtDNA *mitochondriale Desoxyribonucleinsäure*

NAA *N-Acetyl-Aspartat*
NADH *Nicotinamidadenindinukleotid*
nDNA *nukleäre Desoxyribonucleinsäure*
NDUFA6 *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6*
NFT *neurofibrilliäre Stränge*
NFkB *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
NK *Natürliche Killerzellen*
NMDA *N-Methyl-D-Aspartat*
NRF *Nuclear respiratory factor*

Omy *Oligomycin*
OPA1 *Optic Atrophy Protein*
OXPHOS *oxidative Phosphorylierung*

PBMCs *periphere mononukleäre Blutzellen*
PCR *polymerase chain reaction*
PECEME *Etablierung von Biomarkern zur Erfassung des peripheren und zerebralen Energiemetabolismus*
PET *Positronen-Emissions-Tomographie*
PGC-1 α *ivated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PGK1 *Phosphoglycerat Kinase 1*
PKA *Proteinkinase A*
PLT *Blutplättchen*
PreDIVA *Prevention of Vaskular Dementia by Intensive Care*
PS1 *Preselinin 1*
PS2 *Preselinin 2*
pTau *phosphoryliertes Tau*

RBC *Rote Blutzellen*
RDW *red cell distribution width*
RNA *Ribonucleinsäure*
ROS *Reaktive Sauerstoffspezies*
Rot *Rotenon*
ROX *Residual oxygen consumption*
RPMI *Roswell-Park-Memorial-Institute*

SDS *Natriumdodecylsulfat*
SIRT1 *Sirtuin 1*
SIRT3 *Sirtuin 3*
SOD2 *Superoxiddismutase 2*
SPECT *Single Photon Emission Computed Tomographie*
Suc *Succinat*

TFAM *mitochondrialer Transkriptionsfaktor A*
TMPD *Tetramethylphenylendiamin*
TNB *Trinitrobenzol*
TRIS *Tris(hydroxymethyl)-aminomethan*

UCP *Uncoupling Protein*
UE *unerwünschte Ereignisse*

WBC *weiße Blutzellen*
WHR *Waist-Hip-Ratio*

1 Einleitung

1.1 Alterung und Neurodegeneration

Die meisten Menschen können heutzutage erwarten, ein Lebensalter von über 70 Jahren zu erreichen. Die Lebenserwartung für neugeborene Mädchen betrug 2019 in Deutschland 83,3 Jahre, für Jungen 78,5 Jahre. Damit ist die Lebenserwartung in den letzten 25 Jahren um ca. 5 Jahre angestiegen (DESTATIS 2019). In Kombination mit den zurückgehenden Geburtenraten führt dieser Anstieg der Lebenserwartung zu einer rapiden Alterung der Gesellschaft. In den Jahren von 2015 bis 2050 wird sich der Anteil der über 60-Jährigen an der Weltpopulation von 12 % auf 22 % erhöhen (World Health Organization 2015). Im Moment ist Japan das einzige Land, in dem 30 % der Bevölkerung über 60 Jahre alt sind. Allerdings wird sich dies bis 2050 ebenfalls ändern und viele andere Länder werden weltweit vor diesem demografischen Wandel stehen.

Diese Veränderungen sind für jedes einzelne Individuum, aber auch für die gesamte Gesellschaft, eine großartige Chance, jedoch zugleich eine große Herausforderung. Zusätzliche Lebensjahre bringen die Möglichkeit mit sich, sich in neuen Bereichen weiterzubilden oder länger arbeiten zu können. Außerdem tragen ältere Personen auf verschiedensten Wegen zum familiären und gesellschaftlichen Leben bei. Unabdingbar ist es dabei aber, sowohl physisch als auch psychisch gesund zu bleiben. Aus diesem Grund spielt die sogenannte „*Healthy Life Expectancy*“, das heißt, eine Lebenszeit in guter Gesundheit, ohne Erkrankungen und Beeinträchtigungen, eine wichtige Rolle. Sind die zusätzlichen Lebensjahre durch Erkrankungen und Immobilität geprägt, so ist dies negativ für die älteren Menschen und die Gesellschaft anzusehen (World Health Organization 2015).

Mit dem Altern geht ein erhöhtes Risiko für die hauptsächlichen Krankheitsbilder der Menschen, wie Krebserkrankungen, Diabetes und kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen, einher (World Health Organization 2015). Hierbei spielt z.B. die Demenz, als Folge von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung (AD), eine entscheidende Rolle, da sich diese Art der Indisposition langfristig sowohl auf die physische als auch psychische Gesundheit ausüben kann.

Im Jahr 2015 waren mehr als 47 Millionen Menschen weltweit von einer Demenz betroffen. Im Jahre 2030 wird sich diese Zahl voraussichtlich auf 75 Millionen betroffene Menschen erhöhen und bis 2050 sogar verdreifachen (Prince *et al.* 2015). Daraus ergibt sich eine der größten gesundheitsspezifischen Herausforderungen unserer Zeit, da die persönlichen, sozialen und ökonomischen Konsequenzen der Demenz enorm sind. Die Demenz führt zu einer Zunahme

der langfristigen Kosten für den Staat, die Gesellschaft und Familien und zu einem Verlust der Produktivität eines Landes. Im Jahr 2015 wurden die gesamten globalen Kosten für Demenz auf US\$ 818 Milliarden geschätzt (Prince *et al.* 2015). Aus diesem Grund ist es umso wichtiger, effektive Präventions- und Therapieansätze zu entwickeln und präzise und kostengünstige Diagnosemöglichkeiten zu etablieren, die eine frühere Erkennung neurodegenerativer Erkrankungen ermöglichen oder sogar die Entstehung hinauszögern bzw. verhindern können. Hierbei kommt vor allem der Prävention eine entscheidende Rolle zu. Alle pharmakologischen Ansätze, die zum Beispiel die AD ursächlich heilen sollen, sind bisher klinisch gescheitert, weshalb auf absehbarer Zeit nur die Prävention als Option zur Verfügung steht.

1.1.1 Alterung des Gehirns

Die Alterung ist ein Phänomen, welches durch viele Faktoren beeinflusst wird und auf vielen verschiedenen Ebenen wie z.B. zellulärer, molekularer und Gewebsebene passiert und den gesamten Körper betrifft (Cummings 2007). Die Alterung ist mit einer progressiven Abnahme der Fähigkeit der Zellen und des Organismus, mit Stress, Schädigung und Krankheiten umgehen zu können, verbunden (Madreiter-Sokolowski *et al.* 2018). Zelluläre Kennzeichen für Alterung sind in den verschiedenen Organismen oft ähnlich und beinhalten z. B. genomische Instabilität, Telomerverkürzung, Erschöpfung der Stammzellaktivität, Störungen des Energie- und Redoxmetabolismus und mitochondriale Dysfunktion (siehe **Abbildung 1.1**) (López-Otín *et al.* 2013; Madreiter-Sokolowski *et al.* 2018).

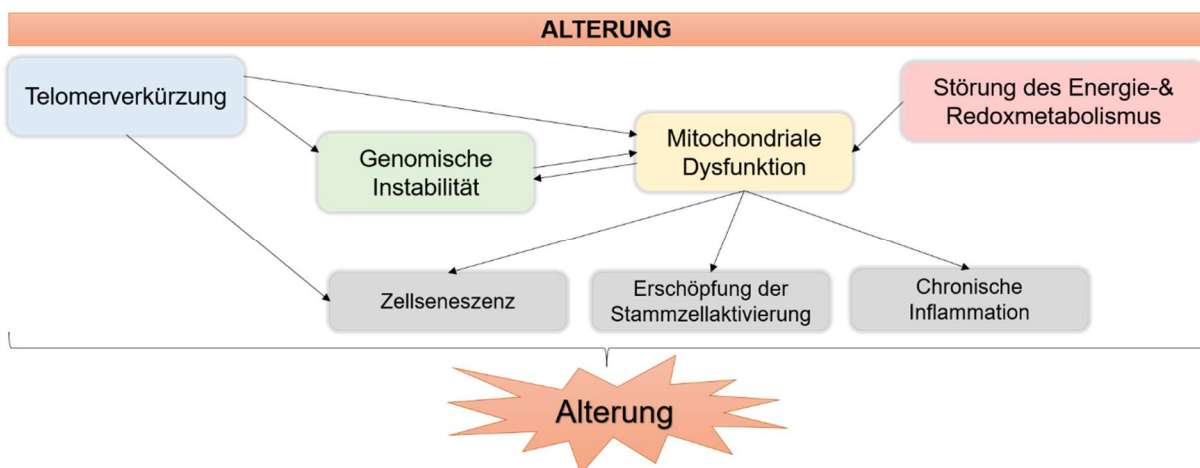


Abbildung 1.1 Zelluläre Kennzeichen für die Alterung (eigene Darstellung). Die zellulären Kennzeichen der Alterung sind zwischen den verschiedenen Organismen oft ähnlich und beinhalten genomische Instabilität, Telomerverkürzung, Erschöpfung der Stammzellaktivität, Störungen des Energie- und Redoxmetabolismus und mitochondriale Dysfunktion. Die Telomerverkürzung führt zur Zellseneszenz und zur Schädigung der DNA, die wiederum die mitochondriale Biogenese über die Runterregulierung des Masterregulator PGC-1 α verringern. Altersbedingte Mutationen der mtDNA führen zur genomischen Instabilität. Diese Schädigungen treten vermehrt auf, da die Reparaturkapazität sowie die antioxidativen Abwehrsysteme abnehmen. Die bei einer mitochondrialen Dysfunktion (MD) vermehrt

gebildeten ROS tragen weiter zur Schädigung der mtDNA und nDNA bei. Die Schädigung der mt und nDNA kann zu einer MD führen, aber diese kann auch durch Anomalien, die mit der Alterung auftreten, hervorgerufen werden. Es kommt zur vermehrten Akkumulation von dysfunktionalen Mitochondrien, die aufgrund der altersbedingten Abnahme der Auto- und Mitophagie nicht ausreichend abgebaut werden. Die MD führt zu einer erhöhten ROS-Bildung, zu einer verringerten ATP-Produktion, zu einer Abnahme der antioxidativen Enzyme und zu einem gestörten Calciummetabolismus. Der vermehrte oxidative Stress durch die MD führt zu einer chronischen Inflammation und führt in Kombination mit der verminderten ATP-Produktion und generell reduzierten Mitochondrienfunktion zur Zellseneszenz. Diese Faktoren führen auch zur Erschöpfung der Stammzellaktivierung, da nicht mehr ausreichend Energie vorhanden ist. Eine Störung des Energie- und Redoxmetabolismus führt zu einer Abnahme der mitochondrialen Funktion und erhöht dadurch ebenfalls die ROS-Bildung. Die Kombination dieser Prozesse trägt dann wiederum zur Alterung bei. *mtDNA=mitogene Desoxyribonukleinsäure; nDNA=nukleäre Desoxyribonukleinsäure; ROS=Reaktive Sauerstoffspezies.*

Vor allem die altersbedingten Veränderungen des zentralen Nervensystems und somit auch des Gehirns und die damit einhergehenden Folgen sind für das einzelne Individuum von Bedeutung. Der Begriff „*normal brain aging*“ wird verwendet, um die normale Alterung des Gehirns zu beschreiben, die keine klinisch diagnostizierte neurodegenerative, psychiatrische oder verwandte Pathologien einschließt (Smiljanic *et al.* 2017). Es kommt allerdings bei der normalen Alterung zu molekularen Veränderungen, die auch bei vielen Erkrankungen beobachtet werden können.

Die Alterung hat unterschiedliche Effekte auf die neurologische Funktion. Mit dem Alter sinkt sowohl die Fähigkeit, Informationen schnell zu verarbeiten als auch die Fähigkeit zur Problemlösung. Es kommt zu einer Verschlechterung des Arbeits- und Langzeitgedächtnisses sowie der räumlichen Orientierung (Park & Reuter-Lorenz 2009). Bei der Gedächtnisfunktion sind vor allem das episodische und semantische Gedächtnis betroffen (Mayeux *et al.* 2001). Zusätzlich dazu nehmen auch die motorischen Fähigkeiten und Funktionen wie die Reaktionszeit, Bewegungsgeschwindigkeit und Hand- und Fußkoordination im Laufe des Alterungsprozesses ab. Es können auch Veränderungen des Gemütszustandes sowie eine veränderte Wahrnehmung und Empfindung von Emotionen auftreten (Park & Reuter-Lorenz 2009; Christensen 2001). Neben den Effekten auf die neurologische Funktion kommt es zu makroskopischen Veränderungen im alternden Gehirn. Das Gewicht und Volumen des Gehirns reduziert sich ab einem Alter von 40 Jahren alle 10 Jahre um 5 % (Svennerholm *et al.* 1997). Diese Reduktion steigt bei über 70-Jährigen noch weiter an. Der Volumenverlust ist assoziiert mit einer Zunahme des ventrikulären Volumens und der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) (Scahill *et al.* 2003; Smiljanic *et al.* 2017). Diese Veränderungen sind regional unterschiedlich. Der frontale und parietale Cortex sind von den Gewichts- und Volumenabnahmen stärker betroffen als der temporale und occipitale Cortex (Scahill *et al.* 2003; Resnick *et al.* 2003). Das Striatum ist ebenfalls betroffen (Resnick *et al.* 2003).

Weiterhin kommt es bei der Alterung des Gehirns auch zu zellulären und molekularen Veränderungen. Ein Schlüsselfaktor, der eine entscheidende Rolle bei der Alterung spielt, ist der vom Gehirn zur ausreichenden Energieproduktion benötigte hohe oxidative Metabolismus. Obwohl das Gehirn nur 2 % der Körpermasse ausmacht, verbraucht es 25% der gesamten Glucose des gesamten Körpers (Rossi *et al.* 2001). Das Gehirn produziert den größten Anteil der benötigten Energie über die mitochondriale Atmungskette, deren Funktion immer mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht (Grune 2014; Mori & Mook-Jung 2016). Die gebildeten freien Radikale schädigen Proteine, Lipide und Nukleinsäuren. Diese Schädigung führt in Kombination mit der altersbedingten Abnahme der Aktivität und Effektivität von Reparatursystemen und Mechanismen zu einer Veränderung der Funktionalität von Proteinen, der Intaktheit von Membranen und durch Schäden an der DNA zur Produktion von abnormalen und fehlgefalteten Proteinen (Grune 2014; Smiljanic *et al.* 2017). Die fehlgefalteten Proteine akkumulieren im Gehirn, da die Kapazität der Elimination solcher Proteine ebenfalls mit dem Alter abnimmt. Auch bei wichtigen Neurotrophinen wie dem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), kommt es zu altersbedingten Veränderungen. BDNF stimuliert die synaptische Plastizität und Erinnerungsbildung und zeigt protektive Effekte auf das Überleben und die Aufrechterhaltung der neuronalen Strukturen im Erwachsenenalter. Altersbedingt kommt es zu einer Abnahme der peripheren und wahrscheinlich auch cerebralen Konzentrationen an BDNF, wodurch er seine Funktionen nicht mehr in vollem Maße ausführen kann (Marinus *et al.* 2019). Eine altersassoziierte Abnahme der Neurotransmitter Serotonin, Glutamat und Dopamin trägt ebenfalls zu den altersbedingten Veränderungen der Gehirnfunktion bei (Mattson *et al.* 2004; Bäckman *et al.* 2006).

Ein weiteres entscheidendes Merkmal des Alterungsprozesses im Gehirn sind Veränderungen der synaptischen Plastizität. Neuronale Verbindungen sind dynamisch und können sich als Antwort auf extrinsische und intrinsische Stimuli verändern. Diese Plastizität erlaubt dem Gehirn, Schädigungen durch Verletzungen oder Krankheiten zu kompensieren und sich an veränderte Anforderungen und Umgebungen anzupassen (Lernfähigkeit und Bildung von Erinnerungen). Im Rahmen des physiologischen Alterns verlangsamen sich plastische Prozesse. Die Anzahl der Synapsen sinkt und die Morphologie der synaptischen Kontakte verändert sich (Schaefers & Teuchert-Noodt 2016).

Diese altersbedingten Veränderungen des Gehirns machen die Gehirnalterung zu einem der wichtigsten Risikofaktoren für die AD.

1.1.2 Alzheimer Erkrankung

In Deutschland leben zurzeit 1,7 Millionen Menschen mit einer Demenz. Jährlich kommt es zu mehr als 300.000 Neuerkrankungen und bis 2050 wird die Anzahl an Demenzkranken in Deutschland bis auf 3 Millionen ansteigen. Zwei Drittel der Erkrankten leiden unter der Alzheimer Erkrankung (Alzheimer Europe 2018).

Bei der Alzheimer Erkrankung (AD) handelt es sich um eine progressive neurodegenerative Erkrankung mit frühbeginnendem Gedächtnisverlust und zunehmenden, schweren kognitiven Symptomen, die zu einer Demenz führen. Die genaue Ursache bzw. Ursachen der AD sind noch nicht bekannt, aber wie bei den meisten chronischen Erkrankungen vermutet man ein Einwirken von multiplen Faktoren (siehe **Abbildung 1.3**). Man kann bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit jedoch prinzipiell zwei Formen unterscheiden, die familiäre (FAD) und sporadische Alzheimer Krankheit.

Bei der FAD handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Form der Alzheimer Krankheit, die nur bei 10 % der Patienten als Ursache der Erkrankung auftritt und noch vor dem 65. Lebensjahr beginnt (Eckert *et al.* 2003; Hauptmann *et al.* 2009). Die familiäre Form wird vor allem mit Mutationen in den Genen assoziiert, die für Preselinin 1 (PS1), Preselinin 2 (PS2) und das Amyloid β Precursor Protein (APP) codieren (Keil *et al.* 2006). Jede der drei Mutationen führt zu einer gesteigerten Produktion und Akkumulation von Amyloid β (A β). Bei der sporadischen AD stellt das Altern den Hauptrisikofaktor dar (Oboudiyat *et al.* 2013; Eckert *et al.* 2003). Das Risiko, an AD zu erkranken, verdoppelt sich nach dem Erreichen des 65. Lebensjahres alle 5 Jahre und es besteht ab einem Alter von 85 Jahren eine 50 %ige Chance an AD zu erkranken. Die meistens AD-Patienten erkranken an dieser Form. Allerdings konnten auch bei der spätbeginnenden, sporadischen AD (LOAD) genetische Varianten identifiziert werden, die mit einem höheren Risiko für die Erkrankung an AD einhergehen (Winblad *et al.* 2016). Hierbei muss vor allem das ϵ_4 Allel, eine spezifische Variante des Apolipoprotein E Gens (APOE- ϵ_4), hervorgehoben werden. Bei diesem Allel handelt es sich um einen signifikanten Risikofaktor für AD (Saunders *et al.* 1993; Bertram *et al.* 2007; Genin *et al.* 2011).

Patienten mit einer sporadischen AD oder FAD teilen die gleichen allgemeinen klinischen und neuropathologischen Symptome, wie z.B. die extraneuronalen, toxischen Amyloid-Oligomere und Plaques, intraneuronale neurofibrilläre Bündel (NFT), die aus hyperphosphoryliertem Tau bestehen, regionsspezifische Abnahmen des zerebralen Glucosemetabolismus, synaptische und mitochondriale Dysfunktion (Oboudiyat *et al.* 2013).

In den letzten Jahren gab es viele verschiedene Theorien, was die AD Pathologie bedingt und wie abnormale Prozesse zur Bildung von Amyloid-Plaques und NFTs führen. Eine Hypothese,

die seit Jahrzehnten im Fokus der Alzheimer Forschung steht, ist die Amyloid Hypothese (Hardy & Higgins 1992). Die meisten genetischen Formen, die zur Alzheimer Erkrankung führen, stehen in Verbindung mit der A β -Prozessierung. Amyloid β ist ein Peptid, welches aus APP durch die Spaltung mittels der γ -Sekretase gebildet wird (siehe **Abbildung 1.2**).

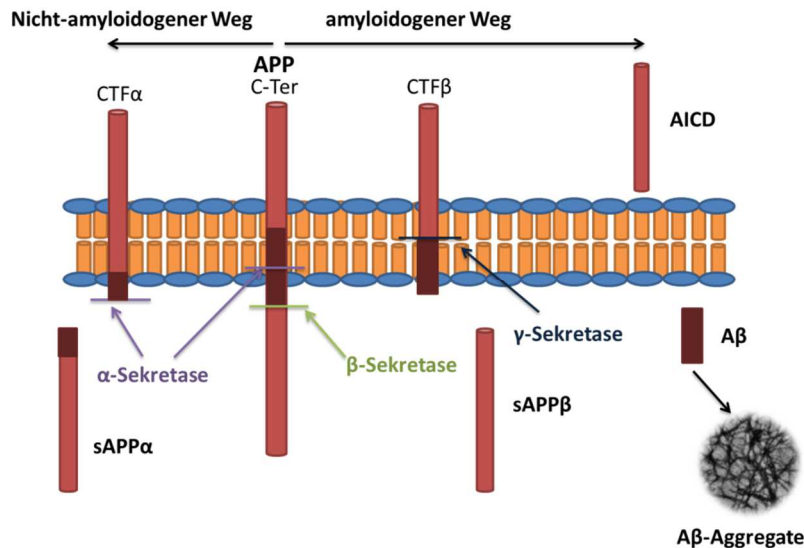


Abbildung 1.2 Die APP-Prozessierung - Nicht-amyloidegenere und amyloidegenere Weg (modifiziert nach (Picone et al. 2014)). Die APP-Prozessierung kann in zwei Wege geteilt werden. Der nicht-amyloidegenere Weg wird durch die α -Sekretase initiiert, die mit der A β -Domäne spaltet und die Freisetzung von A β so verhindert. Die β -Sekretase initiiert den amyloidegenere Weg und generiert lösliches β -sekretiertes APP (sAPP β) und das membrangebundene Fragment CTF β . Beide Fragmente sind Substrate für die γ -Sekretase, die CTF β weiter prozessiert und so das amyloidegenere A β -Fragment und die APP intrazelluläre Domäne (AICD) freisetzt. A β bildet dann durch eine Fehlfaltung fibrilläre Aggregate. AICD=Amyloid precursor protein intrazelluläre Domäne; APP=Amyloid β Precursor Protein; A β =Amyloid β ; CTF=C-terminales Fragment.

Die Akkumulation von intra- und extrazellulären Amyloid-Plaques oder -Oligomeren wird für entscheidend, aber nicht unbedingt notwendig für die Entwicklung von AD gehalten. Personen mit einer Amyloid-Deposition haben ein erhöhtes Risiko an AD zu erkranken, allerdings gibt es auch Personen mit AD, die keine Amyloid-Plaques oder Oligomere aufweisen (Pike *et al.* 2007; Herrup 2015). Die Effekte von Amyloid sind multifaktoriell, aber basierend auf der Amyloid-Hypothese, wird vermutet, dass es durch erhöhten oxidativen Stress, mitochondriale Dysfunktion, synaptische Unterbrechung und die Hyperphosphorylierung von Tau zur Entwicklung der AD kommt. Allerdings sind in den letzten Jahren viele Amyloid-spezifischen Therapien gescheitert (Alzheimer's Association 2019), was wiederum bedeutet, dass die Amyloid Entfernung bzw. die Verhinderung der Bildung entweder früher im AD Kontinuum stattfinden muss, die Pathogenese unabhängig von der Amyloid Deposition stattfindet und/ oder Amyloid das Ende einer irreversiblen Kaskade von Events signalisiert, die zur Neurodegeneration führen (Drachman 2014; Herrup 2015).

Neben der Amyloid-Hypothese existiert die Tau-Hypothese. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Phosphoprotein, welches durch alternatives RNA-Splicing entsteht. Die Phosphorylierung des Taus beeinträchtigt die Fähigkeit des Tauproteins, die Mikrotubuli-Anordnung zu stimulieren, negativ. Mikrotubulis sind die strukturelle Hauptkomponente des Cytoskeletts der Nervenzellen und sind in den axonalen Transport involviert. Das Tau-Protein ist die Hauptkomponente der neurofibrillären Stränge, die im Gehirn von AD-Patienten zu finden sind. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Mikrotubuli Anordnung in Gehirnen von AD-Patienten beeinträchtigt ist und dass dieses Defizit durch die Hyperphosphorylierung von Tau ausgelöst worden sein könnte (Daccache *et al.* 2011; Oboudiyat *et al.* 2013). Tau könnte möglicherweise auch synergistisch mit Amyloid eine neuronale Dysfunktion auslösen (Ittner & Götz 2011).

Ein Glucose-Hypometabolismus sowie eine mitochondriale Dysfunktion werden ebenfalls als mögliche Ursachen der AD-Pathologie diskutiert und rücken in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Immer mehr Studien deuten an, dass Abnormitäten im Glucosemetabolismus, in der mitochondrialen Funktion und damit verbundener oxidativer Stress unveränderliche Eigenschaften der AD darstellen und schon Jahrzehnte vor dem Einsetzen der ersten klinischen Symptome sowohl bei der familiären als auch sporadischen AD-Form auftreten (Gibson & Shi 2010). Ein regional beeinträchtigter Glucosemetabolismus ist ein Marker für eine synaptische Dysfunktion. Bei APOE ϵ positiven, jüngeren Erwachsenen konnte bereits vor der Entwicklung einer frühen AD ein verminderter Glucosemetabolismus im Gehirn festgestellt werden (Reiman *et al.* 2004). Eine mitochondriale Dysfunktion (MD) scheint ebenfalls ein Schlüsselfaktor in der Pathogenese von AD zu sein (siehe **1.1.2.1**) (Swerdlow *et al.* 2014). Amyloid und Tau könnten zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen, aber eine mitochondriale Dysfunktion führt auch zu einem Glucosehypometabolismus und wird häufig bereits früh bei Personen detektiert, die ein erhöhtes Risiko für AD haben (Silva *et al.* 2012). Außerdem kann die MD zu den meisten der Mechanismen führen, bei denen vermutet wird, dass sie die Hirnfunktion bei AD beeinträchtigen. Hierzu zählen z.B. oxidativer Stress, Apoptose und die Inhibition der Proteindegradierung und Autophagie, die dann wiederum zur Akkumulation von Amyloid und phosphorylierten Tau führt. Veränderungen in der Calcium-Homöostase führen ebenfalls zu klinischen Symptomen. Diese Abnormitäten im Calciummetabolismus werden durch einen abnormalen Glucosemetabolismus und MD verstärkt (Supnet & Bezprozvanny 2010). Aufgrund dieser starken Effekte auf die Pathogenese der AD rücken Präventionsansätze und Therapien, die die mitochondriale Funktion oder den Glucosemetabolismus als Ziel haben, immer weiter in den Fokus der Forschung.

Ein letzter Mechanismus, der bei der Pathologie der AD berücksichtigt werden muss, ist die gesteigerte Insulinresistenz, die in den Gehirnen von AD-Patienten detektiert werden konnte. Diese Insulinresistenz verringert die Aufnahme der Glucose in das Gehirn, aber sie kann auch

unabhängig davon zur AD-Pathologie beitragen (Middleton & Yaffe 2010). Die Interaktion oder Beschleunigung der Pathogenese findet vor allem über verlängertes, fehlerhaftes Insulin oder den *Insulin-like growth factor* (IGF) – Weg statt (Schneider *et al.* 2007; Schneider *et al.* 2009).

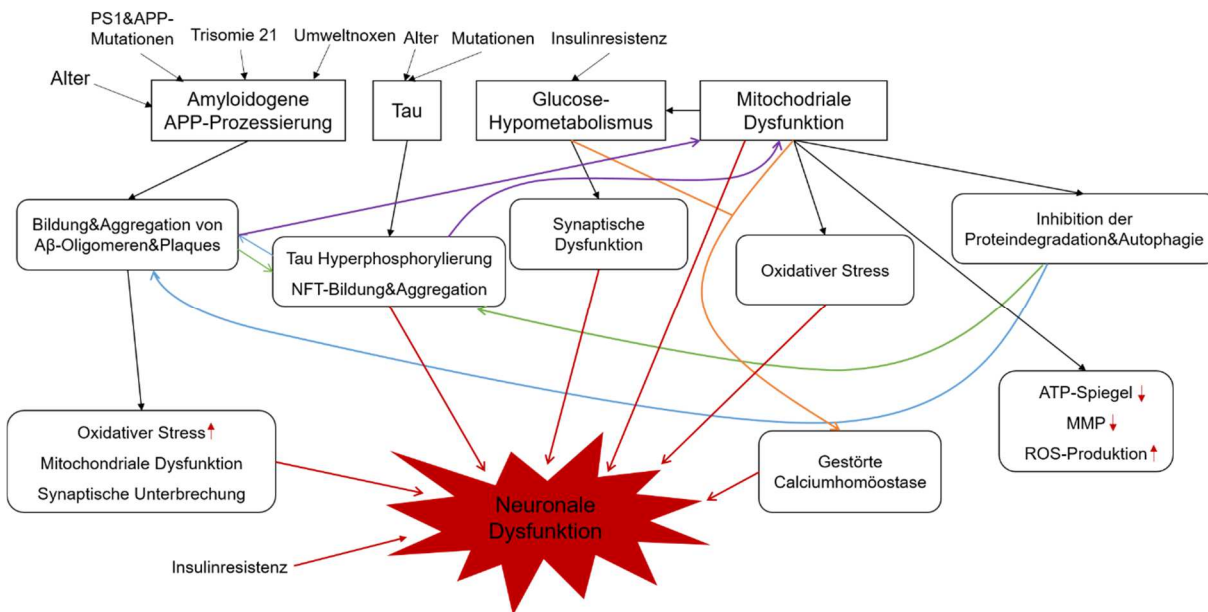


Abbildung 1.3 Einflussfaktoren und Ursachen der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung.

Die Alzheimer Erkrankung hat multifaktorielle Ursachen. Vier Hauptfaktoren sind vermutlich die amyloidogene APP-Prozessierung, hyperphosphoryliertes Tau, ein Glucose-Hypometabolismus und die mitochondriale Dysfunktion (MD). Alle vier Zustände können im Laufe des Alterungsprozesses auftreten. Die amyloidogene APP-Prozessierung kann außerdem durch Mutationen im Preselinin-1 und -2 Gen und APP-Gen, durch Trisomie 21 und Umwelttoxinen hervorgerufen werden. Mutationen können ebenfalls das Protein Tau beeinflussen und eine mit dem Alter auftretende Insulinresistenz und MD können zu einem Glucose-Hypometabolismus des Gehirns beitragen. Die amyloidogene APP-Prozessierung führt zur Bildung und Aggregation von Aβ-Oligomeren und Plaques, die wiederum die Tau-Hyperphosphorylierung und damit NFT-Bildung und -Aggregation begünstigen können. Außerdem kann die Akkumulation von Aβ zu einer MD führen und dadurch sowie durch gesteigerten oxidativen Stress und synaptische Unterbrechungen zu einer neuronalen Dysfunktion beitragen. Die Hyperphosphorylierung von Tau und die NFT-Bildung und Aggregation kann ebenfalls die mitochondriale Funktion negativ beeinflussen, die Bildung von Aβ-Oligomeren und Aggregaten stimulieren und eine neuronale Dysfunktion auslösen. Der auftretende Glucose-Hypometabolismus kann zu einer synaptischen Dysfunktion führen, die schlussendlich ebenfalls in der neuronalen Dysfunktion endet. Die durch mehrere Faktoren bedingte MD führt zusammen mit dem Glucose-Hypometabolismus zu einer gestörten Calciumhomöostase, die ebenfalls zur Entstehung der neuronalen Dysfunktion beiträgt. Weiterhin führt die MD zu gesteigertem oxidativen Stress durch eine vermehrte ROS-Bildung, zu einer verringerten ATP-Produktion und einer Abnahme des MMPs. Der vermehrte oxidative Stress kann ebenfalls zur neuronalen Dysfunktion führen. Durch die Inhibition der Proteindegradation und Autophagie trägt die MD zur Bildung und Aggregation von Aβ und NFTs bei. *APP*=Amyloid β Precursor Protein; *ATP*=Adenosintriphosphate; *Aβ*=Amyloid β; *MD*=mitochondriale Dysfunktion; *MMP*=mitochondriales Membranpotential; *NFT*=neurofibrilläre Stränge; *ROS*=reaktive Sauerstoffspezies.

Wie oben bereits beschrieben können die Ablagerungen von Aβ und Tau auf der einen Seite zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen. Auf der anderen Seite kann aber auch die mitochondriale Dysfunktion die Aβ-Akkumulation sowie die Bildung von NFTs über eine Inhibition

der Proteindegradation und Autophagie begünstigen. Die mitochondriale Dysfunktion kann außerdem den Glucosehypometabolismus beeinflussen und beide führen wiederum zu einer gestörten Calciumhomöostase. Insgesamt scheinen alle Theorien sich gegenseitig zu beeinflussen und damit gemeinsam zur Entstehung der Erkrankung beizutragen (siehe **Abbildung 1.3**).

Für eine zukünftig effektive Behandlung von AD ist eine frühzeitige Diagnose essentiell. Zurzeit beinhaltet die Diagnostik der AD psychometrische Tests, bildgebende Verfahren und Liquordiagnostik. Psychometrische Tests wie der Mini Mental Status Test (MMST) oder die CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) – Testbatterie werden zur Erfassung der kognitiven Leistung herangezogen. Bildgebende Verfahren zählen nicht zur Routinediagnostik, allerdings können mittels dieser Verfahren A β -Fibrillen über Positronen-Emissionstomographie (PET) sichtbar gemacht werden und der Metabolismus von APP mittels Isotopenmarkierung von A β -Peptiden analysiert werden (Single Photon Emission Computed Tomographie (SPECT)) (Selkoe & Hardy 2016). Zudem können über eine Magnetresonanztomographie (MRT) Veränderungen des Hirnvolumens untersucht werden. Mittels Liquordiagnostik können außerdem lösliche A β -Monomere und Tau in der CSF nachgewiesen werden. Die Erforschung weiterer, kostengünstiger Biomarker mithilfe derer die Erkrankung frühzeitig erkannt werden kann, ist sowohl für die Diagnostik als auch für die Forschung essentiell (Jack *et al.* 2018). Hierfür könnte möglicherweise ein von Schindler *et al.* entwickelter Labortest in Frage kommen, der zwei β -Amyloide bereits in geringen Konzentrationen im Blut nachweisen kann (Schindler *et al.* 2019).

Die therapeutischen Möglichkeiten für die AD sind bisher sehr begrenzt. Es existieren zwar bereits zugelassene Medikamente zur Behandlung der Grundsymptomatik der AD, wie Acetylcholinesterase-Hemmer und der nicht-kompetitive N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Antagonist Memantin, aber derzeit gibt es keine Medikamente, die den pathobiologischen Krankheitsverlauf verzögern oder sogar aufhalten können (Cummings *et al.* 2019). Die Forschung konzentriert sich zurzeit vor allem auf gegen A β gerichtete Therapien. Allerdings konnte, wie bereits zuvor erwähnt, keine dieser Behandlungen in klinischen Studien der Phase III überzeugen. Weitere Therapieansätze umfassen β - und γ -Sekretasehemmer, sowie Immunisierungen, Stammzelltherapien und A β -Antikörper (Cummings *et al.* 2019; Selkoe & Hardy 2016). In einer Phase III-Studie befindet sich der vielversprechende Amyloid-Antikörper Aducanumab (Cummings *et al.* 2019). Die Erforschung von Medikamenten, die Tau adressieren, nimmt immer weiter zu. Zurzeit befindet sich ein Tau-Inhibitor in einer Phase III Studie (Cummings *et al.* 2019). Aufgrund der fehlenden Therapiemöglichkeiten setzt die Forschung aktuell auch auf eine frühzeitige Prävention der Erkrankung wie z.B. durch nutritive, physische und kognitive Strategien, die die Entstehung der Erkrankung hinauszögern und im besten Falle sogar verhindern (siehe **1.4**).

Milde kognitive Beeinträchtigungen

Bei milden kognitiven Beeinträchtigungen (MCI) handelt es sich um kognitive Beeinträchtigungen, die für die Definition als Demenz noch zu gering sind. Es handelt sich dabei aber um die erste Manifestation einer grundlegenden AD-Pathologie. Ungefähr 15 bis 20 % der Personen über 65 Jahre oder älter weisen eine MCI auf (Roberts & Knopman 2013). Von einer MCI betroffene Personen haben ein höheres Risiko, eine Alzheimer oder eine andere Demenzform zu entwickeln (Kantarci *et al.* 2009; Mitchell & Shiri-Feshki 2009). Durchschnittlich 32 % der Personen mit MCI erkranken innerhalb von fünf Jahren an der Alzheimer Erkrankung (Ward *et al.* 2013). Jedoch kann eine MCI auch andere Ursachen haben und muss nicht immer in der Entwicklung einer AD enden. Bei manchen Betroffenen regeneriert sich die kognitive Funktion wieder oder es kommt zu keiner weiteren Verschlechterung (Alzheimer's Association 2019). Für die klinische Diagnose einer MCI sollte der Patient bzw. ein Angehöriger bereits Beeinträchtigungen der kognitiven Funktion bemerkt haben. Die kognitive Beeinträchtigung bei diesen Personen ist noch nicht so ausgeprägt, dass die Aktivitäten des täglichen Lebens nicht mehr ohne externe Hilfe durchgeführt werden können und soziale und berufliche Fähigkeiten und Kompetenzen sind noch vorhanden (Vega & Newhouse 2014). Die Beeinträchtigungen treten in einem oder mehreren kognitiven Bereichen auf. Zu den kognitiven Bereichen zählen Gedächtnis, ausführende Funktionen, visuospatiale Fähigkeiten, Sprache, Aufmerksamkeit und das episodische Gedächtnis. Bei standardisierten kognitiven Tests liegen die Ergebnisse der Personen 1 bis 1,5 Standardabweichungen unter denen für Alter, Bildung und kulturelle Hintergründe angepassten *Scores* (Oboudiyat *et al.* 2013).

Zahlreiche Forscher glauben, dass zukünftige Therapien am effektivsten sind, wenn sie bereits im Stadium der MCI eingesetzt werden (Alzheimer's Association 2019). Aus diesem Grund kommt dieser Patientengruppe bei der Erforschung der Pathophysiologie der Alzheimer Erkrankung sowie bei der Entwicklung und Erprobung von neuen Therapien eine entscheidende Rolle zu.

1.1.2.1 Mitochondriale Kaskadenhypothese der AD

Wie bereits unter 1.1.2 erwähnt, spielt neben den Amyloid- und Tau-Hypothesen auch die mitochondriale Dysfunktion eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung. Da die Amyloid-Hypothese vor allem auf Studien basiert, die die seltene autosomal dominante Variante der AD untersucht haben, erklären die Erkenntnisse nicht unbedingt die Ursache der späteinsetzenden, sporadischen Form der AD. Zur Erklärung der Ursachen der Alterung und der sporadischen AD existieren bereits seit vielen Jahrzehnten „Mitochondrien“

und „freie Radikale“ –Theorien. Diese basieren auf Daten, bei denen eine Abnahme der Aktivität der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETC) (Trounce *et al.* 1989; Wu *et al.* 2001; Yen *et al.* 1989; Cooper *et al.* 1992; Ojaimi *et al.* 1999) und einen Anstieg des durch Mitochondrien generierten oxidativen Stress im Alter beobachtet werden konnte (Harman 1972; Miquel *et al.* 1980; Beckman & Ames 1998; Melov 2000). Swerdlow und Khan haben auf Grundlage dieser Erkenntnisse 2004 die mitochondriale Kaskadentheorie formuliert, die die möglichen Ursachen für die Entstehung der sporadischen AD beschreibt (Swerdlow & Khan 2004). Die Autoren postulieren, dass eine niedrige mitochondriale oxidative Phosphorylierung, eine gesteigerte Nutzung der anaerobischen Glycolyse und eine hohe mitochondriale ROS-Produktion, entweder direkt oder indirekt, zu den histo- und pathophysiologischen Ursachen der sporadischen, späteinsetzenden AD beitragen.

Im Modell der mitochondrialen Kaskadentheorie bestimmt die vererbte, genbestimmte Zusammensetzung der Elektronentransportkette eines Individuums die Aktivität der Atmungskette sowie die Basalraten der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die bestehende Korrelation zwischen der basalen ROS-Bildungsrate und den mtDNA-Mutationen führt dazu, dass eine höhere ROS-Produktion zu einer rapiden Akkumulation von Schäden an der mtDNA führt. Die mtDNA-Mutationen führen wiederum zu einer Abnahme der Aktivität und Effektivität der Atmungskettenkomplexe, was eine verringerte oxidative Phosphorylierung und eine gesteigerte ROS-Produktion auslöst. Diese Prozesse bedingen dann drei weitere Ereignisse. Es kommt zu einer Reset-Antwort, bei der die Zellen auf die mitochondriale ROS-Überproduktion mit der Bildung von A β reagieren. Dies verstärkt weiter die mitochondriale Dysfunktion. Bei dem zweiten Ereignis kommt es zur Entfernung von dysfunktionalen Zellen, indem Apoptoseprozesse initiiert werden. Dies führt wiederum erneut zu einer übermäßigen ROS-Produktion sowie zu einer weiteren Abnahme der oxidativen Phosphorylierung. Als letzten Schritt versucht das System verlorene Zellen zu ersetzen, indem neuronale Vorläuferzellen erfolglos versuchen, wieder in den Zellzyklus einzutreten. Die Folgen dieses fehlgeschlagenen Prozesses sind Aneuploidie, die Tau-Phosphorylierung und die Bildung von NFTs (Swerdlow & Khan 2004).

Die mitochondriale Kaskadentheorie wird durch zahlreiche Studien unterstützt (Cortopassi *et al.* 1992; Papa 1996; Lin *et al.* 2002; Chomyn & Attardi 2003) und auch aktuelle Forschungen (Lane *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2019; Wang *et al.* 2019) zeigen, dass dieser Ansatz zur Erklärung der Ursachen der sporadischen AD sowie auch der biologischen Alterung heute noch aktuell ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird in **Kapitel 1.2.2** die Rolle der mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und AD deshalb nochmal ausführlich thematisiert.

1.2 Mitochondriale Funktion als Schlüsselfaktor bei der Alterung und AD

1.2.1 Aufbau und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind komplexe, netzwerkformende Organellen, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Sie sind die hauptsächlichen Energieproduzenten eukaryotischer Zellen. Neben der Energieproduktion durch die oxidative Phosphorylierung (siehe **Abbildung 1.4**) spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Homöostase, dem Calciummetabolismus und dem Metabolismus von Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten. Darüber hinaus sind sie an der Apoptose beteiligt, bei Teilen der Harnstoff-, Steroidhormon- und Hämsynthese und sind wichtig für die angeborene Immunität (Haas 2019).

Mitochondrien sind 0,75 µm bis 3 µm groß und variieren in Größe und Struktur (Wang *et al.* 2019). Sie bestehen aus einer inneren und äußeren Mitochondrienmembran, die aus einer Phospholipiddoppelschicht und verschiedenen Proteinen aufgebaut ist. Die äußere Mitochondrienmembran grenzt das Organell zum Cytoplasma der Zelle ab und beinhaltet zahlreiche integrale Membranproteine. Hierzu zählen auch die Porine, die für die hohe Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran für Moleküle bis zu einer Größe von 5000 Da verantwortlich sind. Die innere Mitochondrienmembran hingegen weist eine geringe Permeabilität auf. In die Membran sind Translokasen für den Import von Proteinen, der Adenosinnukleotidtransporter, sowie andere Carrierproteine für den Transport von hydrophilen Komponenten integriert. Zusätzlich dazu beinhaltet sie noch die Proteine des Elektronen-Transfer-Systems (ETS). Die Komplexe, die die oxidative Phosphorylierung katalysieren, sind präzise in der inneren Mitochondrienmembran angeordnet, um eine hohe Effizienz und Anpassungsfähigkeit zu gewährleisten. Die innere Membran bildet Einstülpungen, die sogenannten Cristae, aus, die zu einer starken Oberflächenvergrößerung beitragen. Von der inneren Mitochondrienmembran wird der Matrixraum des Mitochondriums eingeschlossen, in dem die endgültige Oxidation von Nahrungsmetaboliten in Form der β -Oxidation der Fettsäuren und des Citratzyklus stattfindet.

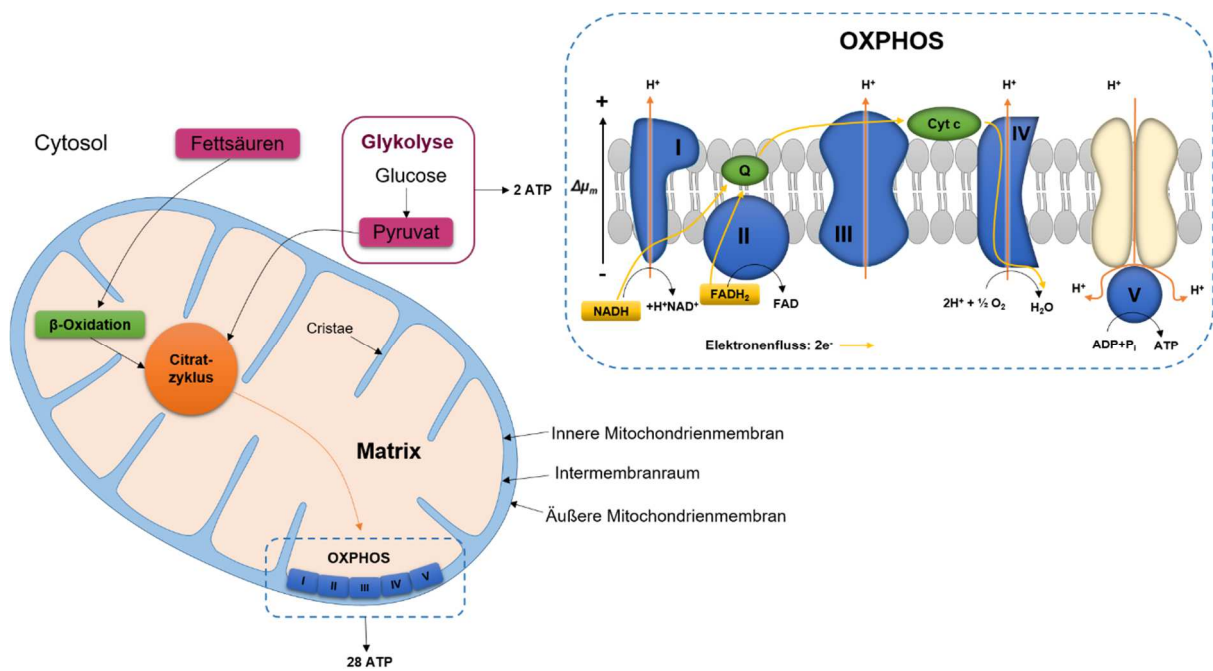


Abbildung 1.4 Aufbau und Rolle des Mitochondriums im Energiemetabolismus. Die Mitochondrien besitzen eine innere und äußere Mitochondrienmembran. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum. Die äußere Membran weist eine höhere Permeabilität auf, die innere eine geringe. Die innere Membran bildet Einstülpungen, die sogenannten Cristae, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Von der inneren Mitochondrienmembran wird der Matrixraum eingeschlossen, in dem die β -Oxidation und der Citratzyklus stattfinden. Der Citratzyklus baut die Produkte aus der β -Oxidation und Glykolyse weiter ab und liefert die Elektronen für die mitochondriale Respiration. Die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette sind präzise in der inneren Mitochondrienmembran angeordnet. Vom Komplex I und II werden über das Coenzym Q und das Elektronen transportierende Flavoprotein (FMN) Elektronen aus dem Citratzyklus auf den Komplex III übertragen. Von Komplex III werden die Elektronen über Cytochrom c und Komplex IV auf den Sauerstoff transferiert. Der gleichzeitig über die innere Mitochondrienmembran aufgebaute Protonengradient wird im Komplex V für die ATP-Synthese genutzt.

Mitochondrien besitzen ihr eigenes Genom. Dies ist durch die Endosymbiontentheorie begründet, laut der Mitochondrien durch die Symbiose des α -Proteobakterium mit einer eukaryotischen Wirtszelle entstanden sind (Gray *et al.* 1999). Mitochondrien vermehren sich unabhängig von der Mitose durch Teilung. Die mitochondriale DNA (mtDNA) liegt in der Matrix als doppelsträngiges zirkuläres Molekül vor. Die mtDNA ist polyploid, d.h. pro Zelle können, je nach Energiebedarf der Zelle, zwischen 100 und 10.000 mtDNA-Kopien vorliegen (Chinnery & Hudson 2013). Die Vererbung der 16.569 Basenpaare langen mtDNA erfolgt maternal. Die mtDNA enthält 37 codierende Gene. Die Mehrheit der Gene des Enzymkomplexes der mitochondrialen Atmungskette wird allerdings durch das nukleäre Genom (nDNA) codiert. Die mtDNA weist bei geringerer Reparaturkapazität eine zehnfach höhere Mutationsrate auf als die nDNA, was entscheidend zur Rolle der Mitochondrien bei der Alterung und AD beiträgt (Haas 2019).

Atmungskette

In der inneren Mitochondrienmembran findet die oxidative Phosphorylierung statt (siehe **Abbildung 1.4**). Vier Multiproteinkomplexe (Komplex I bis IV) formen hier die mitochondriale Atmungskette. Über sie wird die Energie, die durch den Elektronentransfer von NADH und FADH₂ auf O₂ entsteht, zur Produktion von ATP mittels der ATP-Synthase (Komplex V) genutzt.

Über den Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und II (Succinat-Dehydrogenase) gelangen zunächst die Elektronen von NADH und FADH₂ in die Atmungskette. Es handelt sich dabei um reduzierte Moleküle, die aus dem Citratzyklus stammen. Komplex I und II geben die aufgenommenen Elektronen und Protonen an Ubichinon (Coenzym Q) weiter, welches zu Ubichinol reduziert und protoniert wird. Komplex II ist gleichzeitig eine Komponente des Citratzyklus, der die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert. Dadurch werden weitere Elektronen des reduzierten FADH₂ auf das Coenzym Q übertragen. Das reduzierte Coenzym Q wird anschließend von Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) mit Hilfe von Cytochrom c oxidiert, indem die Elektronen auf Cytochrom c übertragen werden. Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase) nimmt dann die Elektronen von Cytochrom c auf, oxidiert es dadurch und überträgt so die Elektronen auf O₂. Gleichzeitig zu diesen Prozessen bauen der Komplex I, III und IV ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran auf und der generierte Protonenfluss wird genutzt, um über Komplex V ATP zu produzieren. Die ATP-Synthase ist damit das letzte Enzym der OXPHOS. Sie wird angetrieben durch den Rückstrom der im Intermembranraum gespeicherten Protonen entlang des elektrochemischen Gradienten zurück in die Matrix, was wiederum die Synthese von ATP aus ADP und Pi antreibt. Dieses System muss einwandfrei funktionieren, um ausreichend Energie für die Zellen zu produzieren und die unbegrenzte Bildung von Superoxiden zu verhindern.

Mitochondriale Biogenese

Mitochondrien teilen sich ständig, fusionieren, ändern ihre Größe und Form und bilden dynamische Netzwerke, um ihre Integrität und Quantität zu erhalten. Die Balance zwischen diesen Fusion- und Fission-Prozessen ist essentiell für die Gesundheit der Zellen (Haas 2019). Die Mitofusin 1 und 2 Proteine (Mfn1/2) sind involviert in die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran, wohingegen das *Optic Atrophy Protein* (OPA1) die Fusion der inneren Mitochondrienmembran organisiert. Die Proteine *Mitochondrial fission 1* (Fis1) und *dynamin-related Protein* (Drp1) sind mit der mitochondrialen Fission assoziiert. Fis 1 ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, Drp1 ist ein cytoplasmatisches Protein, das in die Mitochondrien transloziert und mit Fis 1 interagiert, um so die Fission zu verstärken (Wang *et al.* 2019).

Der Prozess der mitochondrialen Biogenese ist reguliert, um die Population an Mitochondrien an den sich ändernden Energiebedarf der Zellen anzupassen. PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α) ist der Schlüsselregulator der mitochondrialen Biogenese und reagiert direkt mit dem Transkriptionsfaktor NRF1 (Wang *et al.* 2019). Die *Nuclear Respiratory factors* 1 und 2 (NRF1 und 2) aktivieren die Expression von Cytochrom C und erhöhen die Transkription der nukleären Atmungskettenkomplexuntereinheiten. Darüber hinaus fördern sie die Expression von nuklear-kodierten Komponenten der mitochondrialen Transkription und Translation, darunter den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM). Diese sind zur Biosynthese der auf der mtDNA kodierten Atmungskettenkomplexuntereinheiten nötig (Scarpulla 2008). Zudem sind NRFs an der Expression von Proteinen des mitochondrialen Proteinimportsystems und der Hämbiosynthese beteiligt (Dominy & Puigserver 2013). Einen weiteren Einfluss auf die Biogenese können Sirtuine nehmen. Sirtuine können durch Ernährung, körperliche Aktivität und andere Umweltfaktoren beeinflusst werden. SIRT1, welches überwiegend im Nukleus vorkommt, deacetyliert einige Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren wie u.a. PGC1 α . SIRT3 hingegen ist direkt in den Mitochondrien lokalisiert und reguliert die Antwort auf oxidativen Stress durch die Aktivierung der Superoxiddismutase (Wang *et al.* 2019). Ein weiterer Regulator ist die Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die ein klassischer Sensor für den Energiebedarf in Zellen ist. Ist die ATP-Synthese gestört oder es wird viel ATP verbraucht, so entsteht viel AMP. Dies führt zur Aktivierung der AMPK und darauf zur Aktivierung von PGC-1 α und stimuliert katabole Stoffwechselwege (Wang *et al.* 2019). Ein weiterer Aktivator der Expression von PGC-1 α ist *cAMP response element-binding* Protein 1 (CREB1). CREB1 wird durch die Phosphorylierung mittels Proteinkinase A (PKA) aktiviert und ist ein hauptsächlicher Effektor des cAMP-Signalweges (Mayr & Montminy 2001; Herzig *et al.* 2001). Dieser Signalweg wird als Antwort auf Kälte aktiviert und führt zu einer Hochregulation von *uncoupling* Proteinen und oxidativen Stoffwechselwegen, um im Rahmen der zitterfreien Thermogenese Wärme zu produzieren (Cannon & Nedergaard 2004).

1.2.2 Rolle der mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und AD

Eine zunehmende Anzahl an Studien bestätigt, dass die mitochondriale Dysfunktion ein allumfassender Mechanismus der Alterung und auch vieler altersbedingter Erkrankungen ist (Rera *et al.* 2012; Boland *et al.* 2013; Anderson & Maes 2014; Ahmad *et al.* 2015; Montgomery & Turner 2015). Mitochondrien tragen durch die Bildung von ATP im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung entscheidend zur Energieproduktion bei (siehe 1.2.1) und spielen eine essentielle Rolle bei der Homöostase des Zellmetabolismus, der Signalgebung, Differenzierung

und Seneszenz von Zellen. Dies führt dazu, dass eine altersbedingte Fehlfunktion oder verringerte Funktion der Mitochondrien und die damit einhergehenden Folgen einen starken Einfluss auf verschiedene Funktionen der Zelle haben (siehe **Abbildung 1.5**). Eine beeinträchtigte mitochondriale Funktion und Veränderungen in der mitochondrialen Biogenese werden mit Schlüsselaspekten des Alterns, wie Zellseneszenz, Verringerung der Stammzellaktivierung, genomische Instabilität und chronischer Inflammation, in Verbindung gebracht (siehe **Abbildung 1.1**) (Zhu *et al.* 2019). Die Alterung an sich führt zur Verschlechterung der Funktionalität der Mitochondrien.

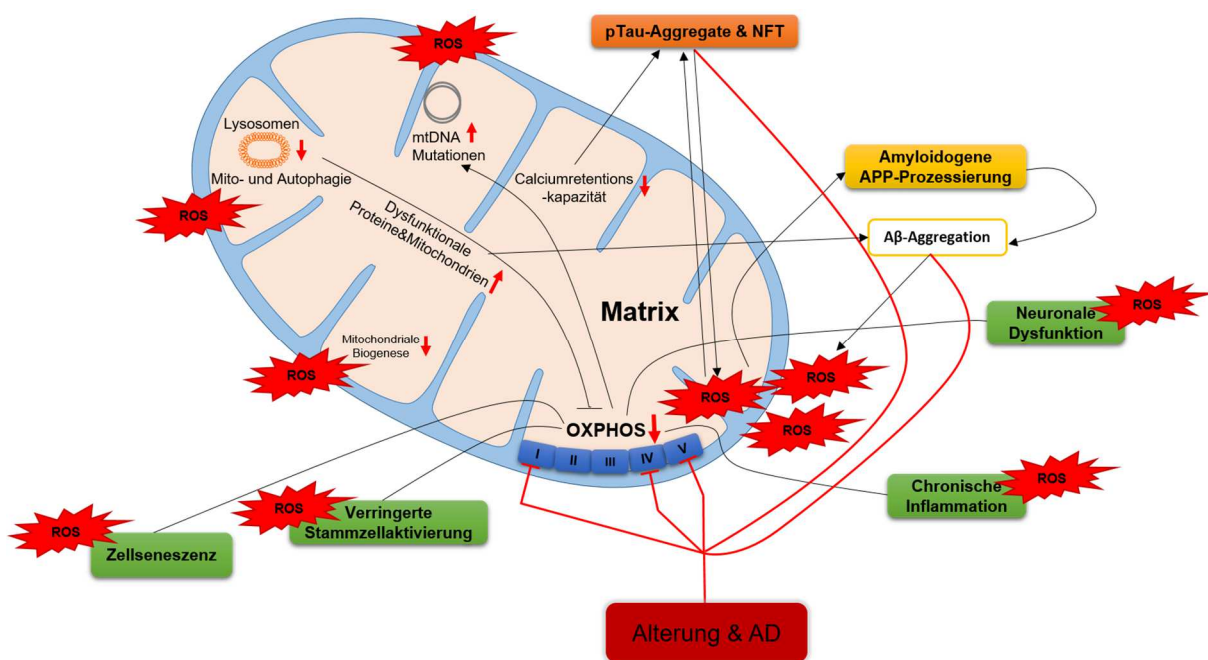


Abbildung 1.5 Rolle der Mitochondrien bei der Alterung und AD. Durch die Alterung kommt es zu einer Verschlechterung der Funktionalität der Mitochondrien und einer Abnahme der mitochondrialen Biogenese. Die mitochondriale Atmungskapazität nimmt ab. Hier sind vor allem Komplex I, IV und die ATP-Synthase betroffen. Diese Abnahme der Atmungskettenaktivität führt zu einer verringerten Energieproduktion, die dann zur Zellseneszenz, einer verringerten Stammzellaktivierung, chronischen Inflammation und neuronalen Dysfunktion führt. Durch die Alterung kommt es zur Zunahme von mtDNA Mutationen, die wiederum zu fehlgefalteten Proteinen führen können und damit die mitochondriale Funktion beeinträchtigen. Diese Ansammlung von fehlgefalteten, dysfunktionalen Proteinen wird noch durch die altersbedingte Abnahme der Auto- und Mitophagie verstärkt. Alle Prozesse führen zur Steigerung der ROS-Produktion, die im Umkehrschluss wiederum zu einer Verstärkung der negativen Prozesse führt. Die vermehrte Bildung von ROS löst die amyloidogenen APP-Prozessierung aus, die zur Akkumulation von A β -Aggregaten führt, die die mitochondriale Atmungsaktivität hemmen und die ROS-Produktion weiter verstärken. Die verringerte Autophagie verstärkt die Ansammlung von A β , da die Aggregate weniger abgebaut werden können. Die vermehrte ROS-Produktion und verringerte Calciumretention führen zur Bildung von pTau-Aggregaten und NFTs, die die mitochondriale Atmungskette ebenfalls inhibieren und die Bildung von ROS weiter stimulieren. APP=Amyloid β Precursor Protein; ATP=Adenosintriphosphate; A β =Amyloid β ; mtDNA=mitochondriale Desoxyribonucleinsäure; NFT=neurofibrilläre Stränge; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; pTau=phosphoryliertes Tau; ROS=reaktive Sauerstoffspezies.

Ihre respiratorische Aktivität nimmt ab, es kommt zur Akkumulation von Schädigungen der mtDNA und dies führt wiederum zu einer Produktion von exzessiven Mengen an ROS (Lane

et al. 2015). Die verringerte respiratorische Aktivität der Mitochondrien sowie der damit einhergehende, aber auch durch die Alterung bedingt gestörte Glucosemetabolismus führen dazu, dass die Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen nicht mehr ausreichend stattfinden kann. Dadurch kommt es zu einer Stammzell dysfunktion, die dann wiederum zur Alterung beiträgt (Zhu *et al.* 2019). Außerdem führt die niedrigere oxidative Phosphorylierung zu einer geringeren Energieproduktion, was vor allem die Neuronen schädigt. Neuronen benötigen im Verhältnis zu anderen Zellen im Körper besonders viel Energie und die Glycolyse in ihnen ist herunterreguliert. Dies macht sie besonders abhängig von der Energieproduktion durch die Mitochondrien (Lane *et al.* 2015). Besonders betroffen von den altersbedingten Veränderungen der mitochondrialen Atmungsaktivität sind Komplex I, III und IV. Zudem erfährt auch die Aktivität der ATP-Synthase eine altersbedingte Abnahme (Yin *et al.* 2014). In den Gehirnen von alten Ratten zeigten sich neben einer Abnahme von antioxidativen Enzymen auch eine Abnahme der Komplex I und IV Aktivität (Navarro & Boveris 2004). Diese Abnahme der Menge und Aktivität von antioxidativen Enzymen und der Komplex IV Aktivität sowie der ATP-Spiegel konnte bei gealterten Mäusen ebenfalls bestätigt werden (Kurokawa *et al.* 2001; Xu *et al.* 2007; Shi *et al.* 2010). Zu den vermehrten Schäden an der mtDNA im Laufe des Alterungsprozesses kommt es, da die die Aktivität und Quantität der für die Reparatur zuständigen DNA-Polymerase 1 und der Endonukleasen verringert sind. Außerdem führen auch die, durch die mitochondriale Dysfunktion bedingten, hohen ROS-Spiegel zu einer weiteren Schädigung der mtDNA, die dann wiederum zur Bildung von fehlerhaften und nicht funktionsfähigen Mitochondrien führt. Im Vergleich zur nDNA ist die mtDNA empfänglicher für Schädigungen durch oxidativen Stress, da sie nicht durch Histone und andere Chromatin-Proteine geschützt ist. Die mtDNA ist unabhängig von der zellulären Teilung, wodurch die Replikationsraten viel höher als bei der nDNA sind, was zu einer intensiveren Auswirkung der Mutationen führt (Wang *et al.* 2019). Die mit der mitochondrialen Dysfunktion einhergehende vermehrte Schädigung der mtDNA trägt damit mit hoher Intensität zur Alterung bei. Hohe Mengen an ROS schädigen, wie oben bereits erwähnt, die mtDNA, verringern die Stammzellaktivierung, führen zur zellulären Seneszenz, lösen chronische Inflammationen aus und erhöhen natürlich auch weiter die Anzahl an dysfunktionalen Mitochondrien, was wiederum eine weitere Steigerung der ROS-Bildung bedingt (Zhu *et al.* 2019; Wang *et al.* 2019). Ein weiterer Faktor, der diese Kaskade der Alterung beeinflusst, ist die altersbedingte Abnahme der Mito- und Autophagie (Chistiakov *et al.* 2014; Wang *et al.* 2019). Die Fusion- und Fission-Proteine kontrollieren die mitochondriale Dynamik. Nicht mehr funktionierende oder fehlerhafte Mitochondrien werden markiert und selektiv mittels Mitophagie entfernt und dann in den Lysosomen abgebaut. Kommt es zu einer Abnahme dieser Mito- und Autophagie, so resultiert dies in einer Ansammlung von dysfunktionalen Mitochondrien, wodurch sich der oxidative Stress erhöht und die Zellapoptose gesteigert wird. Eine mitochondriale Dysfunktion führt auch zu Veränderungen

der Lysosomen, was wiederum dazu führt, dass dysfunktionale Mitochondrien nicht zügig und effektiv abgebaut werden können (Wang *et al.* 2019). Veränderungen in der mitochondrialen Biogenese werden durch den erhöhten oxidativen Stress sowie die Telomerverkürzung hervorgerufen, zu der es im Laufe der Alterung kommt. Durch die Telomerverkürzung kann es zu Schädigungen der DNA kommen. Dies führt dazu, dass PGC-1 α , der Masterregulator der mitochondrialen Biogenese, unterdrückt wird und dadurch eine Drosselung der mitochondrialen Biogenese eintritt (Zhu *et al.* 2019). Diese eingeschränkte Biogenese trägt wiederum zur Alterung bei.

Die mitochondriale Dysfunktion spielt allerdings, wie oben schon erwähnt, nicht nur bei der physiologischen Alterung eine Rolle, sondern auch bei vielen altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer Erkrankung. Seitdem ein Energiedefizit als fundamentales Merkmal einer AD identifiziert wurde, wird vermutet, dass eine mitochondriale Dysfunktion schon zu einem frühen Zeitpunkt die AD-Pathologie beeinflusst (Manczak *et al.* 2004; Mosconi *et al.* 2008). Der veränderte Metabolismus bei der AD geht mit zahlreichen Veränderungen der Mitochondrien einher. Ähnlich wie bei der physiologischen Alterung kommt es auch bei der AD zu einer veränderten Aktivität des Komplex IV, aber auch der anderen Komplexe (Parker *et al.* 1990; Parker & Parks 1995; Cottrell *et al.* 2001; Bubber *et al.* 2005). Die Veränderung der Komplex IV- Aktivität in einem frühen Stadium der AD scheint durch Veränderungen der mtDNA bedingt zu sein (Weidling & Swerdlow 2019). Gehirne, die von AD betroffen sind, zeigen gesteigerte oxidative Schäden der mtDNA. Die Mitophagie ist ebenfalls verändert. Die Mitochondrien weisen bei der AD einer Veränderung ihrer Morphologie auf. In vielen Regionen in Hirnen von AD Patienten sind eine gesteigerte Variabilität in der Form der Mitochondrien sowie zerstörte Cristae und damit eine verkleinerte Oberfläche des Mitochondriums zu finden (Baloyannis *et al.* 2004). Diese Veränderungen in der mitochondrialen Morphologie sind durch veränderte Fusion- und Fission-Prozesse bedingt und auch bei diesen Prozessen können bei AD Beeinträchtigungen beobachtet werden. Möglicherweise führt das bioenergetische Defizit zu einer Veränderung der Fission-Maschinerie (Zhang *et al.* 2016a), aber es gibt auch Studien, die hier einen Einfluss von Amyloid β sehen (Reddy *et al.* 2018).

Auch zwischen der A β - und Tau-Pathologie und der mitochondrialen Funktion scheint eine Beziehung zu bestehen, denn sie korrelieren in Neuronen mit einer mitochondrialen Dysfunktion (Wang *et al.* 2019). Wie im **Kapitel 1.1.2** beschrieben, entsteht A β aus APP durch die Spaltung mittels α -, β - und γ -Sekretase. Der gesteigerte oxidative Stress, der durch die mitochondriale Dysfunktion entsteht, führt zur Bildung des Lipidperoxidationsproduktes 4-Hydroxynonenal. Dieses Produkt führt zur Modifikation des γ -Sekretasekomplexes, was wiederum zu einer verstärkten γ -Sekretaseaktivität und daraufhin zu einer erhöhten Akkumulation von A β führt (Wang *et al.* 2019). Die durch die mitochondriale Dysfunktion ausgelöste, verringerte

Proteindegradation könnte ebenfalls zu einer Erhöhung der A β -Ablagerungen führen, da die fehlgefalteten Proteine nicht mehr abgebaut werden können. Jedoch gibt es auf der anderen Seite auch zahlreiche Studien, die beschreiben, dass A β die mitochondriale Dysfunktion inklusive Abnahme der Aktivität der Komplexe I und IV, des mitochondrialen Membranpotentials und der ATP- Spiegel auslöst (Rhein *et al.* 2009; Rhein *et al.* 2010; Reddy *et al.* 2004; Keil *et al.* 2004; Crouch *et al.* 2005; Grimm *et al.* 2016a). A β kann eine mitochondriale Dysfunktion über mehrere Wege hervorrufen, wie z.B. eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung, eine gesteigerte ROS-Produktion, Veränderungen in der mitochondrialen Dynamik und durch Interaktion mit den mitochondrialen Proteinen. Die Interaktion mit Cyclophilin z.B. führt zu einer Störung der allgemeinen mitochondrialen Funktion, zur gesteigerten ROS-Produktion und einer Dysregulation der mPTP (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore) (Eckert *et al.* 2012). A β vermindert auch die Membranfluidität, was zu verminderten ATP-Spiegeln, einer Inhibierung der Atmungskettenkomplexe sowie einer erhöhten ROS-Produktion führt (Eckmann *et al.* 2013).

Auch die Tau-Pathologie wird durch die mitochondriale Dysfunktion beeinflusst. Die bei einer MD auftretenden erhöhten Calcium- und ROS-Spiegel führen zu einer Akkumulation von pTau-Aggregaten (Wang *et al.* 2019). Mit einer mitochondrialen Dysfunktion geht häufig auch ein Mangel an antioxidativen Enzymen einher. Melov *et al.* (2007) konnten zeigen, dass ein Mangel an der mitochondrialen SOD2 zu einer pTau-Aggregation in Mäusen führt (Melov *et al.* 2007). pTau oder die aus der Aggregation resultierenden NFT können auch zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen. Mäuse mit einer, durch eine Mutation hervorgerufenen, abnormal hohen Produktion von hyperphosphoryliertem Tau-Protein, zeigten ebenfalls eine altersbedingte mitochondriale Dysfunktion einschließlich einer verminderten Komplex I-Aktivität, geringer mitochondrialer Atmung und reduzierter ATP-Konzentrationen sowie erhöhter ROS-Produktion (Rhein *et al.* 2009). Welche Komponente allerdings zuerst welchen Prozess auslöst, ist, ähnlich wie bei der vermehrten ROS-Bildung und Schädigung der Mitochondrien, noch nicht aufgeklärt.

1.2.3 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion

Die mitochondriale Funktion wird nicht nur durch das Alter beeinflusst, sondern auch durch das Geschlecht eines Organismus. Wie in **Kapitel 1.2.1** beschrieben, werden Mitochondrien maternal vererbt. Im Laufe der Evolution waren die Gene der Mitochondrien aus diesem Grund der Selektion in Frauen länger ausgesetzt und scheinen deshalb besser auf die Funktion in Frauen optimiert zu sein (Tower 2006).

Bei Frauen ist das Risiko für eine Erkrankung an Alzheimer oder einer anderen Demenzform höher als bei Männern. Dies könnte durch die längere Lebenserwartung der Frauen bedingt sein. Werden Frauen erheblich älter als Männer, so steigt mit zunehmendem Alter auch das Risiko einer Erkrankung an AD. Allerdings erkranken auch nach der Berücksichtigung des höheren durchschnittlichen Lebensalters noch immer mehr Frauen an AD. Schätzungen der *Aging, Demographics, and Memory Study (ADAMS)* zeigen, dass bei den über 71-Jährigen in den USA 16 % der Frauen AD oder eine andere Demenzerkrankung haben und nur 11 % der Männer betroffen sind (Wortmann 2015). Die Prävalenz für die AD in Europa wird für Männer auf 3,31 % geschätzt, bei Frauen auf 7,13 %. Die Inzidenz für AD lag in Europa bei den Männern bei 7,02 pro 1000 Personen/Jahr und bei Frauen bei 13,25 pro 1000 Personen/Jahr (Niu *et al.* 2017). Dieser Anstieg der Inzidenz für AD bei Frauen ist allerdings erst bei postmenopausalen Frauen zu beobachten. Davor zeigen die Frauen ein geringeres Risiko für AD als die Männer. Diese Unterschiede können durch die mitochondriale Funktion bedingt sein. Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der antioxidativen Kapazität wurden bereits in mehreren Studien identifiziert (Viña & Borrás 2010; Mandal *et al.* 2012; Gagnard *et al.* 2015; Borrás *et al.* 2003) und es konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien von Frauen im reproduktionsfähigen Alter die Hälfte an Hydrogenperoxiden produzieren wie die von Männern. Frauen haben auch höhere Mengen an antioxidativen Enzymen und Komponenten (Borrás *et al.* 2003; Mandal *et al.* 2012; Viña & Borrás 2010; Gagnard *et al.* 2015). Sie weisen außerdem eine bessere mitochondriale Funktion auf (Gagnard *et al.* 2015; Rutkai *et al.* 2015; Khalifa *et al.* 2017; Silaidos *et al.* 2018). Die Mitochondrien von jungen, reproduktionsfähigen weiblichen Organismen scheinen besser mit stressenden Umweltfaktoren umgehen zu können und sind resistenter gegenüber DNA-Schädigungen und Mutationen (Demarest & McCarthy 2015). Dies ist essentiell bei reproduktionsfähigen Frauen, da sonst geschädigte mtDNA an zukünftige Generationen vererbt wird, die zu schweren mitochondrialen Erkrankungen führen könnte. Diese Geschlechtsunterschiede nehmen allerdings mit dem Alter und einer Ovariectomie ab, was auf eine entscheidende Rolle der Geschlechtshormone hindeutet (Viña & Borrás 2010; Gagnard *et al.* 2015; Borrás *et al.* 2003; Grimm *et al.* 2016a). Die Produktion an männlichen Geschlechtshormonen wie Testosteron nimmt bei den Männern nur minimal ab, aber die Spiegel am weiblichen Geschlechtshormon Estrogen sinken direkt nach Eintritt der Menopause stark (Grimm *et al.* 2016a). Dies Abnahme des Estrogens scheint auch mit einer Abnahme der antioxidativen Kapazität nach Eintritt in die Menopause sowie mit einer gesteigerten ROS-Bildung einherzugehen (siehe **Abbildung 1.6**).

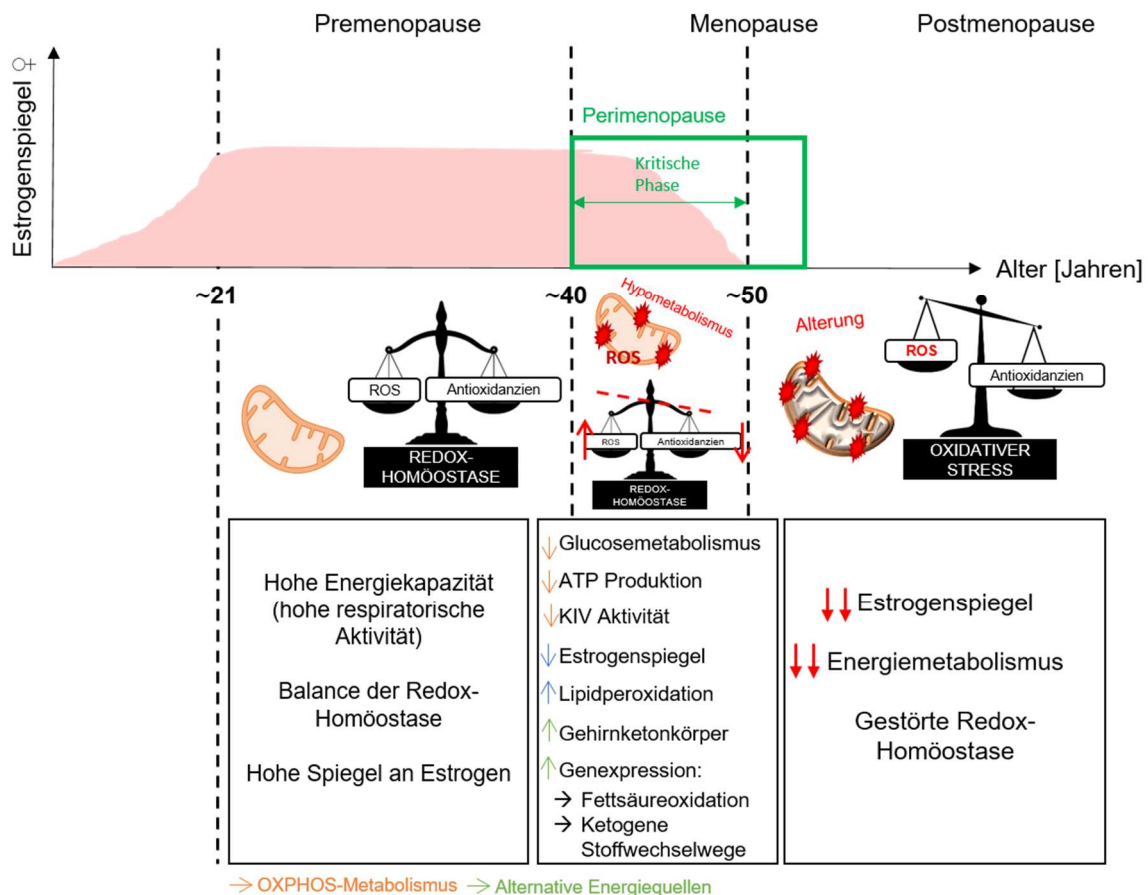


Abbildung 1.6 Veränderungen des Energiemetabolismus bei Frauen im Alterungsprozess (modifiziert nach Lejri et al. 2018). Während der Premenopause weisen die Frauen hohe Estrogenspiegel auf, mit denen eine hohe Energiekapazität (hohe respiratorische Aktivität) und eine balancierte Redox-Homöostase einhergehen. In der Perimenopause kommt es zu einer Abnahme der Estrogenspiegel bei steigendem oxidativen Stress, der dann zu einer zunehmenden Schädigung der Mitochondrien führt und einem Hypometabolismus. Die ATP-Produktion und Komplex IV-Aktivität sinken, die Lipidperoxidation steigt und die Zelle versucht den Hypometabolismus mittels ketogenen Stoffwechselwegen auszugleichen (Anstieg Genexpression von Genen der Fettsäureoxidation und ketogener Stoffwechselwege). In der Postmenopause nehmen die Estrogenspiegel noch stärker ab und der Energiemetabolismus sinkt aufgrund der zunehmenden Schädigung der Mitochondrien immer weiter. Die Redox-Homöostase ist gestört, da es zu einer gesteigerten ROS-Produktion bei gleichzeitig geringeren antioxidativen Schutzsystemen kommt. Die kritische Phase (grüner Pfeil) zeigt eine kurze Periode an, in der die Estrogenspiegel akut stark absinken. In dieser Phase steigt das Risiko für eine spätere Alzheimer Erkrankung. *ATP=Adenosintriphosphat; KIV=Komplex IV; ROS=Reaktive Sauerstoffspezies.*

Neben der Hauptfunktion der Mitochondrien, der Energieproduktion, sind sie auch an der Synthese von Geschlechtshormonen beteiligt. Die Geschlechtshormone wie Estrogen, Androgene und Progesteron können aber die mitochondriale Funktion auch beeinflussen (siehe **Abbildung 1.7**). In den Mitochondrien sind Rezeptoren für die Bindung der Geschlechtshormone vorhanden und der Estrogenrezeptor (ER) kann an die mtDNA binden und so die Transkription und Replikation beeinflussen. Estrogene begünstigen u.a. die mitochondriale Biogenese, indem sie die Expression von mitochondrialen Proteinen des nukleären und mitochondrialen Genoms steigern (Ventura-Clapier et al. 2017). Estrogen bindet z.B. an SIRT3 und erhöht dadurch die Expression von PGC-1 α sowie auch von der SOD2. Weiterhin wird die Expression

von PGC-1 α auch direkt durch Estrogen gesteigert. Estrogen beeinflusst auch die Expression von antioxidativen Enzymen. Ein direkter genomischer Effekt des Estrogens ist untypisch, da weder die SOD, noch die GPx ein Estrogen-response Element in ihrer Promotorregion enthalten. Allerdings aktiviert Estrogen die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), welche wiederum den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert. Dieser steigert dann die Genexpression von antioxidativen Enzymen wie SOD2 und GPx (Viña *et al.* 2008). Eine höhere Produktion an antioxidativen Enzymen könnte die Atmungskettenkomplexe vor Schädigungen von ROS schützen und auch eine mögliche bessere mitochondriale Atmung in Frauen erklären. Die durch Estrogen gesteigerte mitochondriale Biogenese trägt ebenfalls zur besseren mitochondrialen Funktion bei. Grimm *et al.* haben in ihrem Review einige Studien zusammengefasst, in denen es zu einer Estrogen-induzierten Hochregulierung von Genen kommt, die für Komponenten des mitochondrialen ETS codieren (Grimm *et al.* 2016a).

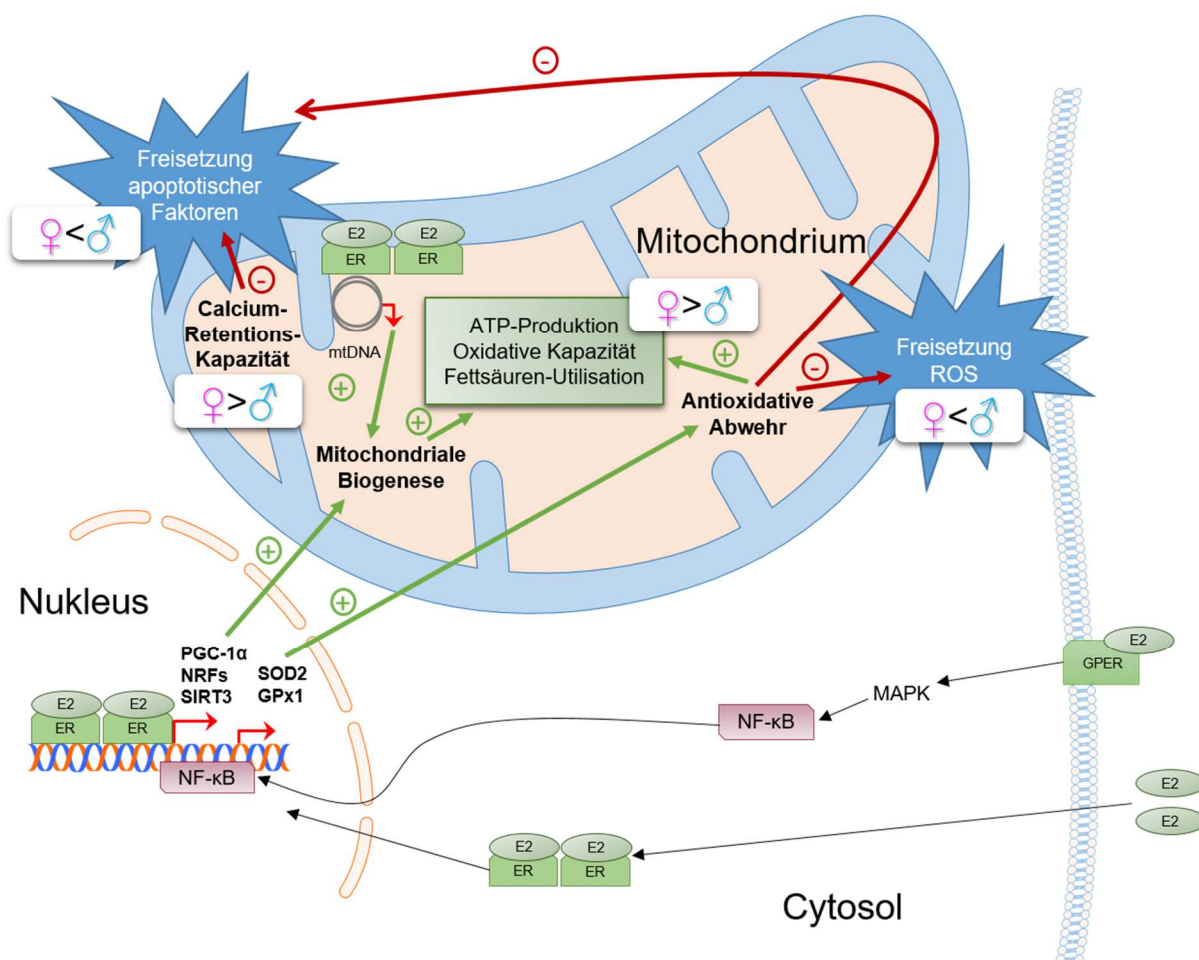


Abbildung 1.7 Einfluss von Estrogen auf die mitochondriale Funktion in den meisten Geweben (modifiziert nach Lejri *et al.* 2018; Ventura-Clapier *et al.* 2017). Die Bindung von Estrogen an seinen cytosolischen Rezeptor führt zu einer Translokation des Estrogen/ER-Komplexes in den Nukleus. Die Interaktion dieses Komplexes mit der nuklearen DNA (nDNA) resultiert in der Transkription von PGC-1 α , NRF und SIRT3, was dann wiederum die mitochondriale Biogenese stimuliert und die antioxidativen Schutzmechanismen steigert. SIRT3 kann dann entweder PGC-1 α stimulieren oder die Expression von SOD2 erhöhen. Estrogen interagiert auch mit den ERs, die an die mtDNA gebunden vorliegen. Dies führt dann zur Transkription und Replikation der mtDNA. Die mitochondriale Biogenese

fördert die ATP-Produktion, Fettsäure-Utilisation und oxidative Kapazität. Das Estrogen kann auch an den G-protein gekoppelten ER an der Plasmamembran binden. Dies aktiviert dann NFκB über den MAPK-Weg. Die NFκB-Aktivierung führt zur Transkription von Genen, die für antioxidative Enzyme codieren, wie z.B. SOD2 und GPx. Diese erhöhte Transkription steigert die antioxidativen Schutzmechanismen, wodurch die Mitochondrien weniger durch ROS geschädigt werden. Dies führt dazu, dass die ATP-Produktion, die Energiekapazität und die Fettsäure-Utilisation erhöht werden. Die hohe antioxidative Kapazität erhält die Integrität der Mitochondrien und hemmt dadurch die Freisetzung von proapoptischen Faktoren und verringert so den Zelltod und erhält die Funktionalität des Gewebes. Die höhere Calcium-Retention trägt bei den Frauen ebenfalls zur verminderten Freisetzung von apoptotischen Faktoren bei. *ATP=Adenosintriphosphat; E2=Estrogen; ER=Estrogenrezeptor; GPER=G-protein gekoppelter Estrogenrezeptor; GPx=Glutathionperoxidase; mtDNA=mitochondriale DNA; MAPK=mitogen-aktivierte Proteinkinase; nDNA=nukleäre DNA; NFκB=Nuklearer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' der aktivierten B-Zellen; NRF=nuclear respiratory factor; PGC-1α=Peroxisome Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Coaktivator 1-alpha; ROS=Reaktive Sauerstoffspezies; SIRT3=Sirtuin 3; SOD2=Superoxiddismutase 2.*

1.3 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) zur Untersuchung der Bioenergetik im Menschen

1.3.1 Zusammenhang zwischen der Bioenergetik im Gehirn und PBMCs

Für die weit verbreitete sporadische AD besteht dringender Bedarf für einen kostengünstigen, zuverlässigen und minimal invasiven biologischen Marker, der die Diagnose und Überwachung der Erkrankung ermöglicht. Ein idealer Biomarker für AD würde helfen, präklinische Erkrankungen zu identifizieren und eine frühzeitige, umfassende Diagnose zu ermöglichen. Außerdem könnte dieser zur Überwachung der Progression der Erkrankung und zur Erfassung der Antwort auf Behandlungen dienen.

Wie bereits im **Kapitel 1.2.2** beschrieben, kommt der mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und der Entstehung von AD eine wichtige Rolle zu. Da Veränderungen im Energiemetabolismus schon sehr früh im Entstehungsprozess der AD detektiert werden können, kommt die MD als potenzieller Marker zur Früherkennung in Frage. Außerdem rückt die MD, als mögliches Target für Präventions- und Therapieansätze, auch aufgrund der fehlgeschlagenen Studien mit Aβ immer mehr in den Vordergrund. Allerdings ist es schwierig, diese mitochondriale Funktion im Gehirn bei lebenden Menschen zu analysieren, da das Gehirn bzw. die Gehirnmasse nicht zugänglich ist. Die Magnetresonanztomographie (MRS) ermöglicht es, Veränderungen spezifischer Stoffwechsel-Prozesse und der beteiligten Metaboliten sowohl über das gesamte Gehirn als auch in spezifischen Hirnregionen nicht invasiv zu identifizieren und zu quantifizieren. In den bisherigen, auf der Protonen-MRS (¹H-MRS) basierenden Studien, die altersassoziierte neurodegenerative Veränderungen des Gehirns untersuchten, zählen das N-Acetylaspartat (NAA), das Kreatin (Cr) sowie Cholin-Verbindungen zu den am häufigsten untersuchten Metaboliten. Mittels der Phosphor-MRS (³¹P-MRS) lassen sich darüber hinaus die

Metaboliten Phospho-Kreatin und ATP des zellulären Energiestoffwechsels quantifizieren. N-Acetylaspartat (NAA) ist nach Glutamat die häufigste freie Aminosäure im Gehirn und wird in hohen Konzentrationen in den Neuronen angereichert (Paslakis *et al.* 2014). NAA wird in den Mitochondrien in energieabhängiger Weise ausschließlich im Nervengewebe synthetisiert (Goldstein 1959; Truckenmiller *et al.* 1985; Paslakis *et al.* 2014). Diese Korrespondenz mit dem Energieumsatz unterstützt die These, dass NAA ein Marker für die mitochondriale Funktion im Gehirn sein könnte (Heales *et al.* 1995; Bates *et al.* 1996; Dautry *et al.* 2000; Signoretti *et al.* 2001; Vagnozzi *et al.* 2007). NAA gilt außerdem als Marker für die Integrität und Viabilität neuronalen Gewebes, die neuronale Dichte und allgemeine neuronale Gesundheit (Moffett *et al.* 2007). Eine Abnahme des NAA im Gehirn konnte in klinischen Studien mit einem Verlust kognitiver Fähigkeiten bis hin zur Demenz assoziiert werden (Pilatus *et al.* 2009; Eylers *et al.* 2016; Schmitz *et al.* 2018). Entsprechend ist der Einsatz von NAA als Neurodegenerations-Marker in der heutigen Neuroimaging-Forschung weit verbreitet.

Allerdings ist diese Methode sehr kostenintensiv und in der Umsetzung aufwendig. Dies macht die Methode für die routinemäßige, frühzeitige Diagnostik oder Erforschung von Präventions- und Therapieansätzen unattraktiv. Aus diesem Grund wird, wie oben bereits erwähnt, ein Biomarker benötigt, der zuverlässig und kostengünstig ist und dessen Bestimmung nur einen minimal invasiven Eingriff benötigt. Die Untersuchung von Blutzellen erfüllt diese Kriterien und ermöglicht eine einfache, günstige und minimal invasive, wiederholbare Probenentnahme.

Zusätzlich dazu deuten immer mehr Studien an, dass die Veränderungen der mitochondrialen Funktion bei der Alterung und AD nicht nur im Gehirn auftreten, sondern auch in der Peripherie (Leutz *et al.* 2002; Schindowski *et al.* 2003; Migliore *et al.* 2005; Leuner *et al.* 2007; Leuner *et al.* 2012). In verschiedenen peripheren Geweben von Alzheimer Patienten kann eine mitochondriale Dysfunktion beobachtet werden, die mit einer gesteigerten ROS-Produktion sowie mit einem erhöhten Auftreten von durch oxidativen Stress hervorgerufenen Zellschäden einhergeht. Beobachtungen an murinen Modellsystemen bestärken die Vermutung, dass mitochondriale Veränderungen im peripheren Gewebe die Situation im Gehirn widerspiegeln und somit ein frühes Symptom der Alzheimer-Pathologie am Menschen erfassbar machen. Aber auch andere Symptome einer AD, wie zum Beispiel kognitive Beeinträchtigungen, können scheinbar in z.B. peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) durch genetische Veränderungen detektiert werden (Cifre *et al.* 2018).

PBMCs scheinen für die Analyse der mitochondrialen Funktion in der Peripherie besonders geeignet zu sein, da sie eine wichtige Rolle in der Immunantwort und dem Metabolismus spielen, mit anderen Zellen und extrazellulären Matrixen überall im Körper kommunizieren und leicht zu isolieren sind (Pani *et al.* 2009). Sie teilen im Vergleich zu anderen Geweben einen Großteil der nicht synaptischen biochemischen Umgebung der Neuronen und enthalten alle

epigenetischen Enzyme und Maschinerien, die in beiden, in Neuronen und peripheren nukleären Zellen, vorhanden sind (Arosio *et al.* 2014). Leuner *et al.* (2012) zeigten in verschiedenen Studien, dass es in Lymphozyten, einer Unterfraktion der PBMCs, von AD-Patienten im Vergleich zu den Lymphozyten der Kontrollpersonen zu einer gesteigerten basalen Apoptose, einer Erhöhung der ROS-Spiegel und der DNA-Oxidation sowie zu Veränderungen in den Konzentrationen an antioxidativen Enzymen und zu einer gesteigerten Anfälligkeit der Mitochondrien kommt (Leuner *et al.* 2012). Auch die mitochondriale Atmungskapazität der Lymphozyten war bei den weiblichen AD-Patienten im Vergleich zu der von sechs gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Kontrollpersonen reduziert.

Delbarba *et al.* (2015) konnten ebenfalls beobachten, dass es im Rahmen von MCI und AD zu peripheren mitochondrialen Beeinträchtigungen kommt. Dazu bestimmten sie in den, aus dem Blut von AD-Patienten, MCI-Patienten und gesunden Probanden isolierten, PMBC verschiedene mitochondrial- und nuklear-codierte Proteine, die in die Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion involviert sind (Delbarba *et al.* 2016).

Weiterhin scheint auch ein Zusammenhang zwischen der cerebralen und der mitochondrialen Funktion in PBMCs zu existieren (Bartolotti *et al.* 2016). Bartolotti *et al.* (2016) untersuchten in ihrer Studie die für die Erinnerungsbildung wichtige CREB-Signalisierung und konnten in einer Studie mit Mäusen eine positive Korrelation zwischen der pCREB-Expression in PBMCs und postmortem im präfrontalen Cortex beobachten (Bartolotti *et al.* 2016). Diese Korrelation deutet an, dass die Expression in den PBMCs die Expression im Gehirn widerspiegelt. Allerdings existieren keine Studien, die den direkten Zusammenhang der mitochondrialen Funktion in peripheren Geweben und dem Gehirn vergleichen.

1.3.2 Zellen des peripheren Blutes

Zu den zellulären Bestandteilen des peripheren Blutes zählen die Erythrozyten (Transport von Sauerstoff), Leukozyten (angeborene und adaptive Immunantwort) und Thrombozyten (Blutgerinnung). Alle zellulären Bestandteile stammen letztendlich von den gleichen Vorläuferzellen ab, den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) im Knochenmark (siehe **Abbildung 1.8**). Aus ihnen entwickeln sich durch die Wirkung verschiedener Zytokine Stammzellen mit einem eingeschränkten Potential, die die Basis für die lymphatische und myeloische Zelllinie darstellen. Aus der myeloischen Vorläuferzelle entwickeln sich eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten, Blutmonozyten und ihre gereifte Form, die Makrophagen, die dendritischen Zellen und die Mastzellen. Diese Leukozyten stellen den größten Teil der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr dar. In dieser Entwicklungsreihe entstehen zusätzlich noch die Erythrozyten und die Thrombozyten, die aus den Megakaryozyten hervorgehen. Die frühen lymphatischen Vorläuferzellen können zu T-Lymphozyten, B-Lymphozyten oder natürlichen

Killerzellen (NK-Zellen) werden. Die unreifen Lymphozyten müssen noch einen weiteren Differenzierungsprozess in den primären lymphatischen Organen durchlaufen. Die B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark, wohingegen die T-Lymphozyten im Thymus heranreifen. Die gebildeten Zellen werden anschließend aus dem Knochenmark ins Blut abgegeben und entfalten ihre entsprechende Wirkung (Rink *et al.* 2015; Murphy & Weaver 2018).

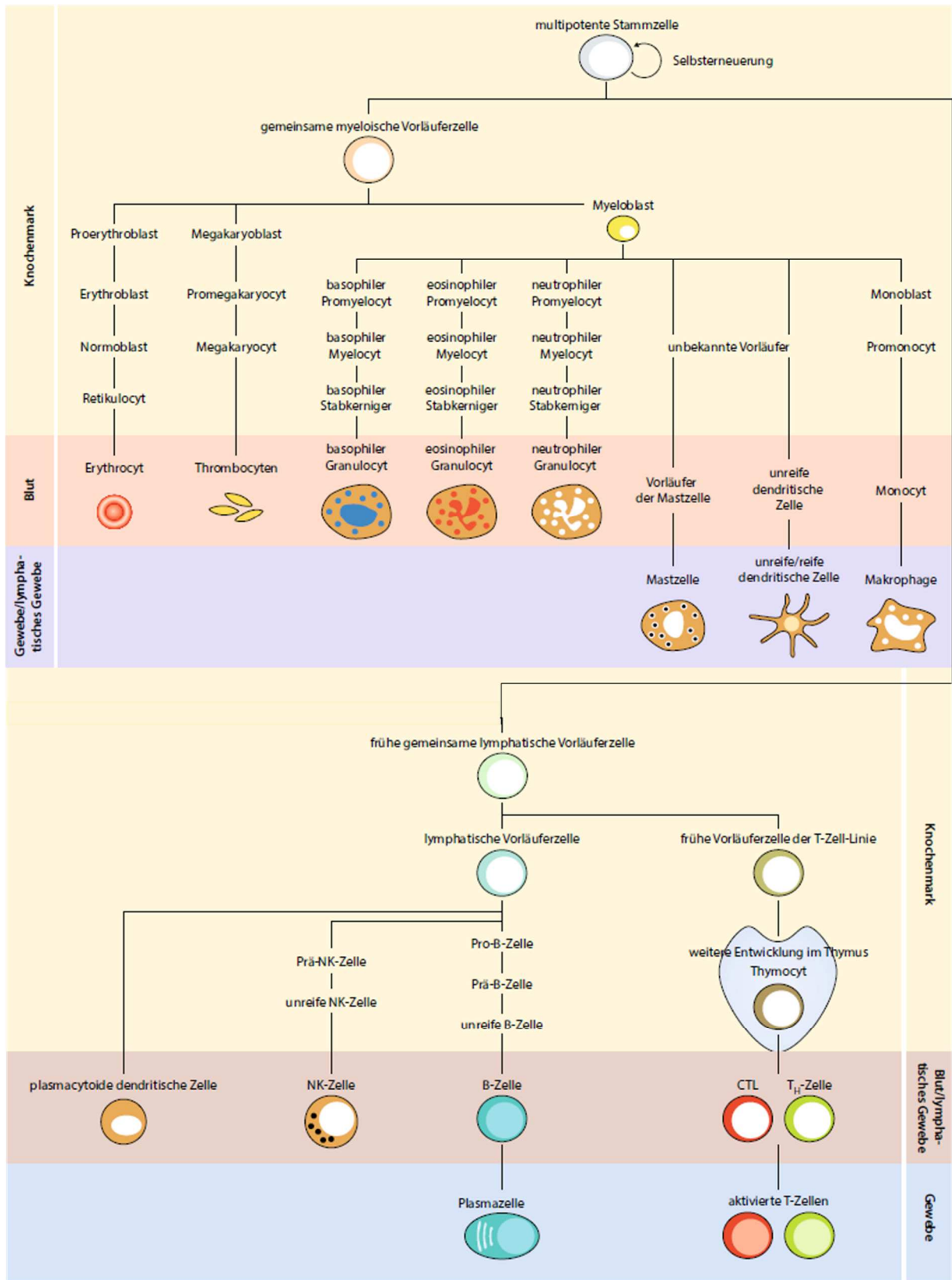


Abbildung 1.8 Hämatopoese im Knochenmark (modifiziert nach Rink *et al.* 2015). Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten stammen alle von einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark ab. Aus ihnen entwickeln sich Stammzellen mit einem eingeschränkten Potential, die die Basis für die lymphatische und myeloische Zelllinie darstellen. Aus der myeloiden Vorläuferzelle entstehen über mehrere Entwicklungsstufen neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Mo-

nozyten, myeloide dendritische Zellen, Mastzellen, Erythrozyten und Thrombozyten. Aus der lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich NK-Zellen, plasmacytoide dendritische Zellen (pDC) und die Zellen des adaptiven Immunsystems, die B-Zellen und die Vorläufer der T-Zellen. Die B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark, wohingegen die T-Lymphozyten im Thymus heranreifen. *CTL=cytotoxischer T-Lymphozyt; NK=Natürliche Killerzellen.*

PBMCs sind definiert als alle Blutzellen, die nur einen runden Nukleus besitzen, wie Lymphozyten, Monozyten oder Makrophagen. Die Lymphozytenpopulation besteht aus CD4+ und CD8+ T- Zellen, B- Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD14+ Monozyten, basophilen, neutrophilen, eosinophilen und dendritischen Zellen (Arosio *et al.* 2014). Beim Menschen variiert die Zusammensetzung individuell sehr stark. Typischerweise machen die Lymphozyten aber 70-90 % aus, die Monozyten variieren von 10 bis 20 %, wohingegen die dendritischen Zellen nur 1-2 % ausmachen. Die Lymphozyten-Population setzt sich aus 70-85 % CD3+ T-Zellen, 5-10 % B-Zellen und 5-20 % NK-Zellen zusammen. Die CD3+-Lymphozyten bestehen wiederum aus CD4+ und CD8+ T-Zellen in einem Verhältnis von 2:1 (Kleiveland 2015).

1.3.2.1 Energetische Profile von Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten

Leukozyten und Blutplättchen (anukleares Fragment der Megakaryozyten) sind die zwei Hauptzelltypen im Blut, die eine aktive und messbare oxidative Phosphorylierung aufweisen. Es gibt viele verschiedene Studien bezüglich Diabetes, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen, in denen signifikante Defekte in der mitochondrialen Funktion in Leukozyten und Plättchen detektiert werden konnten, was ihr Potenzial als Marker für die Diagnose, Überwachung der Progression und therapeutische Interventionen bestätigt (Zharikov & Shiva 2013; Japiassú *et al.* 2011; Widlansky *et al.* 2010; Hanagasi *et al.* 2005) (siehe **1.3.1**). Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten sind unterschiedlich metabolisch programmiert, was sich auf die Messung der mitochondrialen Funktion ausüben kann (Chacko *et al.* 2013). Die Autoren unterscheiden dabei vier verschiedene Prozesse, in Folge derer in den Zellen Sauerstoff verbraucht wird. Hierzu zählen die ATP-gekoppelte Atmung, das *Proton leak*, die Reservekapazität und die nicht-mitochondriale Atmung (siehe **Abbildung 1.9**) (Chacko *et al.* 2013; Kramer *et al.* 2014).

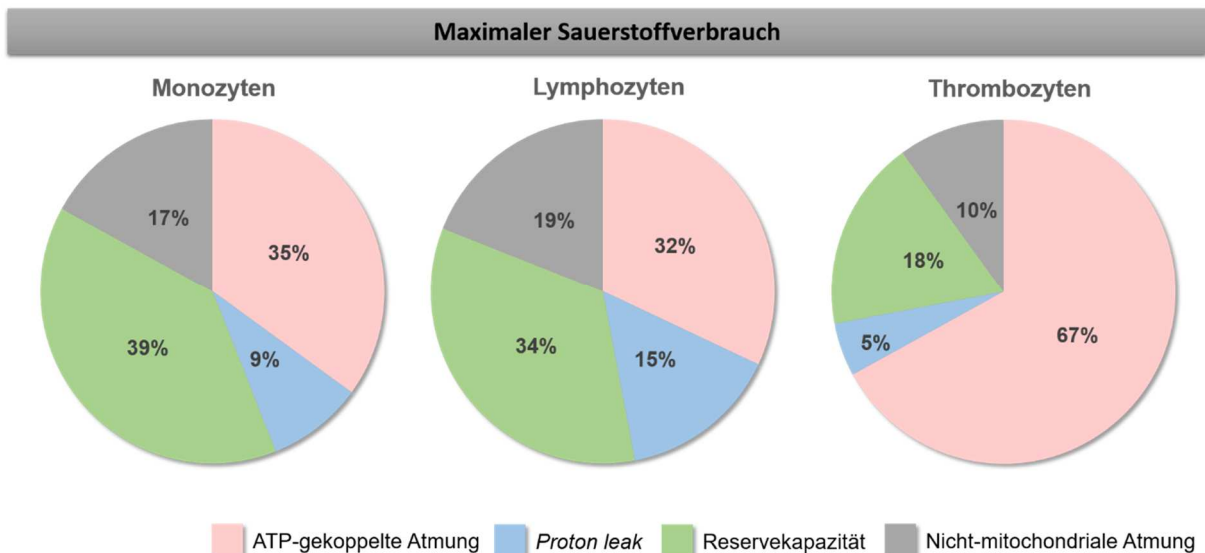


Abbildung 1.9 Energetische Profile der unterschiedlichen Blutzellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil des Sauerstoffverbrauchs an der ATP-gekoppelten Atmung, dem Proton leak, der Reservekapazität und der nicht-mitochondrialen Atmung (Chacko *et al.* 2013; Kramer *et al.* 2014).

Die ATP-gekoppelte Atmung ist der Teil der mitochondrialen Atmung, der zur Synthese von ATP genutzt wird. Das *Proton leak* bezeichnet den Rückfluss von Protonen in die Mitochondrienmatrix, ohne dabei die ATP-Synthase zu durchqueren. Beides zusammen ist die basale mitochondriale Atmung. Die Reservekapazität ist der Unterschied zwischen der basalen und maximalen Atmung. Sie dient als wichtiges Merkmal bei der Untersuchung der Fähigkeit einer Zelle, auf eine erhöhte ATP-Nachfrage zu reagieren. Alle sauerstoffverbrauchenden Prozesse, die nicht auf die Mitochondrien zurückzuführen sind, werden unter dem Begriff der nicht-mitochondrialen Atmung zusammengefasst. Plättchen widmen 55-65 % ihrer mitochondrialen Funktion der ATP-Synthese, was ungefähr doppelt so viel ist, wie Monozyten oder Lymphozyten nutzen. Der Unterschied zwischen dem maximalen Sauerstoffkonsum, induziert durch die ungekoppelte und basale Atmung, wird als freie oder Reservekapazität bezeichnet und kann bei den Zellen zur Bewältigung von oxidativem Stress oder zusätzlichem Energiebedarf genutzt werden. Die Reservekapazität ist in den Monozyten und Lymphozyten am höchsten, wohingegen diese bei den Plättchen nur 20 % der mitochondrialen Atmung ausmacht (Kramer *et al.* 2014). Diese Unterschiede sind auch in der mitochondrialen Proteinzusammensetzung zu sehen. Die Citratsynthase-Spiegel sind in allen Zelltypen gleich, wohingegen das Komplex IV-Untereinheit-1-Protein in höheren Mengen in Monozyten vorkommt als in Lymphozyten, bei einer Untereinheit des Komplex III ist es genau umgekehrt. Komplex III und Komplex IV-Proteinen liegen bei den Plättchen in geringeren Konzentrationen vor (Chacko *et al.* 2013).

Die Berücksichtigung der unterschiedlichen energetischen Profile der peripheren Blutzellen ist für die Verwendung von ihnen für Messungen der mitochondrialen Funktion essentiell. Aus diesem Grund muss eine reine Isolation gewährleistet sein, denn eine Verunreinigung einer

PBMC-Population mit Plättchen verfälscht die Ergebnisse aufgrund der höheren ATP-gekoppelten Atmung und würde nur zu einem gewichteten Mittel der bioenergetischen Aktivität der Zelltypen führen. Generell sind PBMCs besser geeignet um Defekte in den Komplexen I bis IV zu detektieren, da die Monozyten und Lymphozyten eine bioenergetische Reservekapazität zeigen und die Plättchen schon unter basalen Konditionen ihre maximale energetische Kapazität erreichen (Chacko *et al.* 2013).

1.3.3 Einflussfaktoren auf bioenergetische Messungen in PBMCs

Wie in **Kapitel 1.3.1** und **1.3.2** beschrieben, sprechen viele Faktoren und Forschungsergebnisse für die Verwendung von PBMCs. Allerdings ist die Methodik auch vielen Einflüssen ausgesetzt, die die Zellzahl und Zusammensetzung der PBMC Population, den Isolationserfolg sowie auch die anschließenden bioenergetischen Messungen beeinflussen können. Neben der Berücksichtigung der unterschiedlichen energetischen Profile der peripheren Blutzellen und damit einer hohen Reinheit der isolierten Fraktion (siehe **1.3.2.1**), ist bekannt, dass multiple physiologische Faktoren wie Ernährungsverhalten, körperliche Aktivität, Rauchen, Hormonspiegel und Infektion und Inflammation einen Einfluss auf die Messung der bioenergetischen Metaboliten in PBMCs haben können (Alonso *et al.* 2004; Kleiveland 2015; Falco *et al.* 2017; Calton *et al.* 2016; Rocha *et al.* 2017). Die Zusammensetzung der PBMCs ist individuell sehr unterschiedlich und hängt vom Donor und seinem physiologischen Status ab. Im Vergleich zur Verwendung von Zelllinien kann dies zu inter-experimentalen Variationen führen. Der Einschluss von verschiedenen Individuen erhöht zwar die Varianz der Daten, aber die Stärke der reproduzierten Daten mit Zellen von verschiedenen Spendern spricht für die Repräsentativität der Daten (Kleiveland 2015).

1.3.3.1 Einfluss von Melatonin auf die mitochondriale Funktion

Neben den in **Kapitel 1.3.1** erwähnten Einflussfaktoren scheint vor allem das Hormon Melatonin einen starken Einfluss auf die mitochondriale Funktion zu haben. Melatonin wird in circadianen Rhythmen freigesetzt und ist deshalb im Blut zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Konzentrationen vorhanden. Erfordert ein Studiendesign eine Blutabnahme zu mehreren Zeitpunkten, so könnte dies die Ergebnisse der bioenergetischen Messungen aufgrund des antioxidativen Potentials des Melatonins stark beeinflussen.

Die Sekretion von Melatonin ist abhängig vom Hell-Dunkel- Rhythmus. Licht spielt bei der Biosynthese von Melatonin eine entscheidende Rolle und ist in der Lage, diese entsprechend der Lichtexposition zu synchronisieren oder zu hemmen.

Melatonin wird zwar hauptsächlich in der Epiphyse ausgeschüttet, aber es konnte in einigen Studien eine extrapineale Melatoninausschüttung in der Retina, dem Knochenmarkszellen, Thrombozyten, der Haut, den Lymphozyten, dem Cerebellum und besonders im Gastrointestinaltrakt von Vertebraten beobachtet werden (Tordjman *et al.* 2017).

Die Melatoninkonzentration im Blut erhöht sich in der Regel mit Eintritt der Dunkelheit, erreicht einige Stunden nach Mitternacht ihre höchste Konzentration und fällt bei Eintritt der Dämmerung in der Regel wieder ab. Gegen Nachmittag (circa 14 Uhr) sollten nur noch basale Konzentrationen im Blut vorhanden sein. Frauen weisen signifikant höhere Melatonin-Spiegel sowie einen signifikant höheren Amplituden Rhythmus auf als Männer (siehe **Abbildung 1.10**) (Santhi *et al.* 2016; Gunn *et al.* 2016).

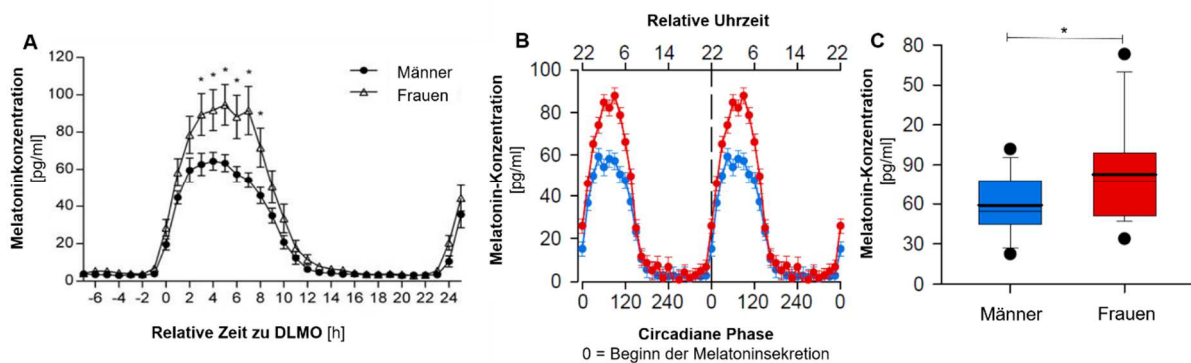


Abbildung 1.10 Melatoninproduktion in Frauen und Männern (modifiziert nach Gunn *et al.* 2016; Santhi *et al.* 2016). **A** Stündlich gemessene Plasma-Melatoninkonzentrationen über 32h. Die Daten wurden relativiert zum persönlichen $DLMO_{25\%}$ aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=28$; Two-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test; (* $p<0,05$) (Gunn *et al.* 2016). **B** Stündlich gemessene Plasma Melatoninkonzentrationen über 28h an drei verschiedenen Zeitpunkten. Mittleres Melatoninprofil von Männern (blau) und Frauen (rot). Alle Daten wurden vorher auf den Beginn der Melatoninausschüttung justiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=34$ (Santhi *et al.* 2016). **C** Box-and-Whisker Blot der Melatonin-Amplitude bei Männern ($59,49\pm 5,95$ pg/ml) und Frauen ($82,62\pm 8,09$ pg/ml); $p<0,035$; (* $p<0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=34$ (Santhi *et al.* 2016). *DLMO=Dim light melatonin onset; $DLMO_{25\%}=DLMO$, definiert als der Zeitpunkt, an dem die Melatoninspiegel 25 % der maximalen Melatoninwerte erreichen.*

Die circadiane Organisation von anderen physiologischen Funktionen hängt ebenfalls vom Melatonin-Signal ab, wie zum Beispiel die Immun- und antioxidative Abwehr, Hämostasis und die Glucoseregulation (Claustrat & Leston 2015).

Das Melatonin wurde vor 3 bis 2,5 Millionen Jahren speziell für die Neutralisierung von toxischem Sauerstoff gebildet. Die Struktur des Melatonins ist noch immer die gleiche, allerdings ist die Funktion vielfältiger geworden. Nach der Entdeckung 1958 wurde als erste Eigenschaft von Melatonin die Fähigkeit der Regulation der Fortpflanzungsfähigkeit von photosensitiven Säugetieren identifiziert. Heute werden dem Hormon eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen zugeschrieben, wie unter anderem antiinflammatorische (Alamili *et al.* 2014) und

antioxidative Eigenschaften, die Modulation des circadianen Rhythmus (Wetterberg 1978; Wurtman & Lieberman 1985) und die Beeinflussung des Schlafes (Scheer *et al.* 2012; Shechter *et al.* 2012). Melatonin agiert als starkes Antioxidanz der endogenen antioxidativen Abwehr (Martín *et al.* 2002). Es kann seine Funktionen sowohl in hydrophilen und lipophilen Regionen der Zelle ausführen, schützt so Lipide, Proteine und die DNA vor oxidativen Schäden (Reiter *et al.* 2013) und liegt vor allem in Regionen der Zelle in hohen Konzentration vor, in denen viele freie Radikale gebildet werden (Lowes *et al.* 2013). Zu diesen, in hohen Mengen ROS produzierenden Bereichen zählen die Mitochondrien, die das Melatonin selektiv aufnehmen (Reiter *et al.* 2018). Außerdem indizieren einige Studien, dass Mitochondrien aufgrund ihres Ursprunges aus Melatonin-produzierenden Bakterien selbst Melatonin synthetisieren können (Wang *et al.* 2017; Zhao *et al.* 2019).

Melatonin spielt eine wichtige Rolle in der zellulären antioxidativen Abwehr, indem es die Synthese von Glutathion (GSH), einem potentem Antioxidanz, durch die Aktivierung des Enzyms γ -Glutamyl-Cystein-Synthase stimuliert (Urata *et al.* 1999). Außerdem beeinflusst es die Genexpression der Glutathionperoxidase, Glutathion-Reduktase, Katalase und Superoxiddismutase. Diese Stimulierung der Expression der antioxidativen Enzyme unterstützt die Aufrechterhaltung des GSH/Glutathiondisulfid (GSSG)-Ratio und resultiert dadurch in einer höheren Recyclingrate des Glutathions (Reiter *et al.* 2001; Galano 2011; Sharafati-Chaleshtori *et al.* 2017). Das Melatonin wirkt sich auch auf die Mitochondrien aus, indem es die mitochondriale Biogenese reguliert und scheinbar positive Effekte auf die Atmungskette ausübt. Hier sind speziell Komplex I und IV und damit auch die ATP- Bildung durch die ATP-Synthase betroffen (Martín *et al.* 2002; Lowes *et al.* 2013; Martín *et al.* 2000; Areti *et al.* 2017; Agil *et al.* 2015). Die mitochondriale Biogenese kann von Melatonin über Sirtuine beeinflusst werden (Bai *et al.* 2016; Cristófol *et al.* 2012; Lee *et al.* 2016).

Aufgrund dieses hohen antioxidativen Potenzials kommt Melatonin bei einem breiten Spektrum an Erkrankungen als potenzieller Therapieansatz in Frage. Die Kombination der chronobiotischen und cytoprotektiven Effekte des Melatonins könnte z. B. beim metabolischen Syndrom effektiv sein (Goyal *et al.* 2014; Abo Taleb & Alghamdi 2020; López-González *et al.* 2015; Wu *et al.* 2001). Andere Studien untersuchten die Wirkung von Melatonin auf die Behandlung der Sepsis in Tieren und Menschen (Reiter *et al.* 2017; Gitto *et al.* 2001; Wu *et al.* 2001). Auch bei neuronalen Erkrankungen konnten in Tierexperimenten begünstigende Effekte auf die Prävention und Verlangsamung der Krankheitsprogression beobachtet werden.

1.4 Prävention der Gehirnalterung und Neurodegeneration

In den letzten Jahrzehnten ist die Lebenserwartung immer weiter angestiegen. Aber das Ziel ist es, nicht nur länger zu leben, sondern diesen Zugewinn an Lebensjahren möglichst auch in

körperlicher und kognitiver Gesundheit zu verbringen. Die Demenz, und hier vor allem die Alzheimer Erkrankung, ist ein Faktor, der die Lebensqualität im Alter enorm beeinträchtigen kann. Trotz intensiver Erforschung der grundlegenden Ursachen der AD und der Suche nach potenziell effektiven Therapien in den letzten Jahren existiert bisher keine effektive Therapie, um die AD zu heilen oder die Progression der Erkrankung signifikant zu inhibieren. Aus diesem Grund verschiebt sich der Fokus der Forschung immer mehr in den Bereich der Krankheitsprävention. Hier spielen auch Veränderungen des Lebensstils eine entscheidende Rolle. Neben nutritiven Strategien, wie z.B. der mediterranen Diät, scheinen körperliche Bewegung und kognitives Training ebenfalls einen potentiell präventiven Charakter zu besitzen. Die Erforschung multimodaler Interventionen, die alle drei Faktoren kombinieren, gewinnt zunehmend an Bedeutung (Tyrovolas *et al.* 2014; Ngandu *et al.* 2015).

1.4.1 Mediterrane Diät

Eine gesunde Ernährung über die gesamte Lebensdauer hinweg spielt eine entscheidende Rolle für eine optimale Entwicklung und die Erhaltung der Gesundheit sowie bei der Prävention von nicht übertragbaren Erkrankungen. Ein gesundes Ernährungsverhalten scheint ein hohes präventives Potential zu besitzen und der Entstehung von Alzheimer direkt oder indirekt, über Risikofaktoren wie kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes, entgegenzuwirken. In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine Veränderung der Ernährung positiv auf Demenz-begünstigende Erkrankungen wie Diabetes (Knowler *et al.* 2002; Tuomilehto *et al.* 2001) oder kardiovaskuläre Erkrankungen auswirkt (Rees *et al.* 2013). Viele verschiedene Tierstudien konnten ebenfalls einen positiven Effekt von diätischen Faktoren auf alters- und AD bedingte Veränderungen, inklusive der mitochondrialen Funktion, beobachten (Swaminathan & Jicha 2014; Hagl *et al.* 2014; Hagl *et al.* 2016a; Hagl *et al.* 2016b; Reutzel *et al.* 2018).

Die mediterrane Diät ist der bei der Demenz, aber auch bei anderen Erkrankungen, am häufigsten untersuchte ernährungsbasierende Präventionsansatz. Die traditionelle mediterrane Diät (MeDi) stammt aus den Ländern Süditalien und Griechenland (hier vor allem von der Insel Kreta) und wurde dort in den 1970er Jahren praktiziert. Die MeDi ist charakterisiert durch eine hohe Aufnahme von Gemüse, Leguminosen, Früchten und Nüssen, vollwertigen Cerealien (Vollkorngetreide) und Olivenöl (bei gleichzeitig geringer Aufnahme von gesättigten Fettsäuren). Weiterhin beinhaltet sie einen moderat hohen Konsum von Fisch, eine niedrige bis moderate Aufnahme von Milch- und Milchprodukten und Alkohol (vor allem in Form von Wein) und eine geringe Aufnahme von Fleisch (Willett *et al.* 1995).

Viele Meta-Analysen zeigen, dass eine hohe Orientierung der Ernährung an den Prinzipien der mediterranen Diät mit einer geringeren Mortalität sowie einem reduzierten Risiko für kardiovaskuläre und neuroplastische Erkrankungen assoziiert ist (Kastorini *et al.* 2011; Sofi *et al.* 2014).

Bezogen auf Demenz und AD kann eine mediterrane Ernährung zu einem reduzierten Risiko für diese Erkrankungen führen (Scarmeas *et al.* 2006; Gardener *et al.* 2012; Tsivgoulis *et al.* 2013; Sofi *et al.* 2014; Singh *et al.* 2014; Wu & Sun 2017). Diese Ergebnisse werden durch die Beobachtung bestätigt, dass eine weniger mediterrane Ernährungsweise mit progressiven Abnormitäten in AD-Biomarkern assoziiert ist (Matthews *et al.* 2014; Luciano *et al.* 2017; Berti *et al.* 2018). Neben einer Verbesserung der kognitiven Leistung (Loughrey *et al.* 2017) ist die MeDi auch mit einer geringeren Gehirnatrophie assoziiert (Gu *et al.* 2015). Die Schlüsselemente dieser Ernährungsform sind, neben der hohen Vitaminaufnahme vermutlich auch der hohe Fischkonsum und damit die hohe Aufnahme an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie ein geringer Verzehr von Fleisch (Gu *et al.* 2015). Der hohe Verzehr an Fisch sowie die Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wird auch unabhängig von der MeDi mit einem geringeren Abbau der kognitiven Leistung in Verbindung gebracht (Zhang *et al.* 2016b; Samieri *et al.* 2018).

Die meisten Ergebnisse stammen allerdings aus epidemiologischen Studien und es gibt nur wenige klinische Studien, die den Effekt der MeDi untersuchen. In zwei randomisiert-kontrollierten Studien wurde der Einfluss einer MeDi, die zusätzlich durch den Konsum von extra nativem Olivenöl oder Nüssen ergänzt wurde, auf altersbedingt kognitive Verluste untersucht. Bei den an der Studie teilnehmenden, älteren Personen konnte eine Verbesserung der kognitiven Funktion durch die Interventionen beobachtet werden (Martínez-Lapiscina *et al.* 2013; Valls-Pedret *et al.* 2015).

Neben diesen vielen positiven Assoziationen einer Ernährung, die sich stark an den Prinzipien der MeDi orientiert, gibt es aber auch Studien, die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der MeDi und kognitiven Beeinträchtigungen finden konnten (Olsson *et al.* 2015; Haring *et al.* 2016).

1.4.2 Körperliche Aktivität

Neben einer gesunden Ernährung scheint ein körperlich aktiver Lebensstil in Verbindung mit der Hirngesundheit zu stehen. In großangelegten Beobachtungsstudien mit *Follow up*-Perioden über mehrere Jahrzehnte entwickelten körperlich aktive Personen im Vergleich zu inaktiven Menschen weniger kognitive Beeinträchtigungen und erkrankten seltener an Demenz und

AD (Hamer & Chida 2009; Sofi *et al.* 2011; Stephen *et al.* 2017; Gallaway *et al.* 2017). Regelmäßige, niedrige oder mittlere Aktivität konnte bei 65 Jahre alten Menschen bereits eine Reduktion des Risikos für kognitive Beeinträchtigungen um 35 % hervorrufen (Lautenschlager & Cox 2013). Die körperliche Aktivität übt sich vermutlich positiv auf die Gehirnstruktur aus, wodurch dieser Effekt zustande kommen könnte (Rovio *et al.* 2010). Sie trägt dazu bei, dass das Gehirn plastischer und adaptiver wird und führt durch einen Einfluss auf die Neurogenese und neuronale Proliferation zur Bildung neuer Neuronen (Colcombe *et al.* 2004; Nagamatsu *et al.* 2012; van Praag *et al.* 1999; Bugg *et al.* 2012; Eadie *et al.* 2005). Durch körperliche Aktivität kommt es zu einem Anstieg von Proteinen, die an kognitiven Prozessen beteiligt sind. Unter anderem beeinflusst körperliches Training neurotrophische Faktoren wie das BDNF, die für das Wachstum, die Differenzierung und den Erhalt von Neuronen essentiell sind. Körperliche Aktivität führt zu einem IGF-1 vermittelten Anstieg des BDNF im Gehirn sowie auch im Blut (Pareja-Galeano *et al.* 2013). Neben diesen Effekten auf die Neurogenese und Plastizität des Gehirns scheint sich physische Aktivität auch positiv auf die mitochondriale Funktion und antioxidative Prozesse auszuüben (Wang *et al.* 2019; Bamidis *et al.* 2014; Bayod *et al.* 2015). Aktivität stimuliert die mitochondriale Aktivität im Gehirn, indem es die Resistenz gegenüber Rotenon, einem Komplex I-Inhibitor, erhöht und die mRNA-Expression von TFAM und NDUFA6 steigert. Bei NDUFA6 handelt es sich um eine Untereinheit des Komplex I. Gleichzeitig wird auch die mtDNA Reparaturkapazität gesteigert und das mitochondriale *Uncoupling* Proteine (UCP) aktiviert, was die mitochondriale Proliferation (Andrews *et al.* 2005) sowie die Produktion von ROS reguliert. Eine Aktivierung des Autophagie/Lysosomen-Weges durch den AMPK Signalweg führt zu einer Steigerung des Abbaus von dysfunktionalen Mitochondrien und erhält damit die hohe Qualität der Mitochondrien in Zellen (Huang *et al.* 2019). Andere mögliche Mechanismen, die zu diesen positiven Assoziationen führen, sind eher indirekt bedingt, wie durch positive Effekte auf Risikofaktoren, zu denen kardiovaskuläre Erkrankungen, Bluthochdruck, Insulinresistenz oder Hypercholesterinämien zählen (World Health Organization 2019).

1.4.3 Kognitives Training

Zusätzlich zu einer Verbesserung der Ernährungsgewohnheiten und einer Steigerung der körperlichen Aktivität wird häufig ein kognitives Trainingsprogramm in multimodale Interventionsprogramme inkludiert. Neben dem kognitiven Training können zur Verbesserung der kognitiven Leistung auch Methoden wie kognitive Stimulation und Rehabilitation angewandt werden. Der Effekt des kognitiven Trainings basiert auf der Annahme, dass das alternde Gehirn und die Kognition durch Training (Plastizität) und sich wiederholende Aufgaben, die die Bereiche Gedächtnis, Aufmerksamkeit und ausführende Funktionen ansprechen, verbessert werden kann. Dies soll vor allem durch funktionelle und strukturelle Veränderungen bedingt sein, die

dann zu einer Reduzierung der kognitiven Beeinträchtigung führen. Das kognitive Training konnte in einigen Studien zu einer Verbesserung des Arbeitsgedächtnisses (Basak et al. 2008; Borella et al. 2010), der Geschwindigkeit der Verarbeitung von Informationen (Schmiedek et al. 2010; Rebok et al. 2014) und der ausführenden Funktion (Karbach & Kray 2009; Anguera et al. 2013) führen. Studien, die den Einfluss von kognitivem Training auf die Gehirnstruktur und Funktion untersuchen, sind eher selten. Positive Veränderungen der Gehirnstruktur konnten in der weißen Substanz vor allem in frontalen (Cao et al. 2016), fronto-temporalen (Chapman et al. 2015), occipito-temporalen (Strenziok et al. 2014) und occipitalen (Cao et al. 2016) Regionen beobachtet werden. Funktionelle Veränderungen wurden vor allem im Bereich des cerebralen Blutflusses (Chapman et al. 2015; Mozolic et al. 2010) und der funktionalen Konnektivität (Cao et al. 2016; Strenziok et al. 2014) beobachtet. Das Training wird häufig computerbasiert durchgeführt und kann alleine oder in Gruppen praktiziert werden (Joubert & Chainay 2018). Aber auch beim kognitiven Training gibt es Studien, die keine Verbesserungen im Gehirn beobachten konnten (Cao et al. 2016; Mozolic et al. 2010; Heinzl et al. 2014).

1.4.4 Multimodale Ansätze zur Prävention

Aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie der AD könnten Interventionen, die mehrere Risikofaktoren und Krankheitsmechanismen gleichzeitig ansprechen, möglicherweise effektiver zur Prävention von AD oder Demenz sein als unimodale Ansätze. In mehreren europäischen Ländern wurden bereits randomisierte kontrollierte Studien durchgeführt, die die Effekte von multimodalen Interventionen bei selbständig lebenden älteren Personen untersuchten (Ngandu *et al.* 2015; van Charante *et al.* 2016; Andrieu *et al.* 2017).

Die FINGER (Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability)-Studie untersuchte den Effekt einer zweijährigen Intervention auf die kognitive Funktion von älteren Personen mit einem erhöhten Risiko für AD, die körperliche Aktivität, Ernährungsberatungen und kognitive und soziale Stimulation beinhaltete. Die Intervention führte zu einer signifikanten Verbesserung der allgemeinen Kognition und des BMIs, der körperlichen Aktivität und der Ernährungsgewohnheiten. Bei der Gedächtnisfunktion konnte keine signifikante Verbesserung beobachtet werden. Allerdings zeigten Post-Hoc-Untersuchungen einen Effekt bei komplexen Erinnerungsaufgaben sowie auf das Risiko der Abnahme der kognitiven Funktion (Ngandu *et al.* 2015). Auch wenn die Effekte der multimodalen Intervention teilweise nur sehr gering waren, könnten diese kleinen Veränderungen langfristig zu einer moderaten Verschiebung des Einsetzens einer Alzheimer Erkrankung führen und damit zu einer Verbesserung der individuellen und sozialen Situation beitragen. Um die langfristigen Auswirkungen der Intervention zu erforschen, planen die Autoren nach sieben Jahren die Studienteilnehmer erneut zu untersuchen. Trotz des langen Interventionszeitraumes von zwei Jahren war die Drop-out

Rate gering und die Adhärenz der Teilnehmer bei den verschiedenen Interventionskomponenten wurde als hoch dokumentiert. Da die Adhärenz allerdings nicht zentral erhoben wurde, sondern die Zahlen auf den Angaben der Studienteilnehmer beruhen, ist ein Einfluss durch *overreporting* nicht auszuschließen. Im Gegensatz zu vielen anderen Studien, handelt es sich bei der Studie um einen langfristigen Interventionsansatz. Fehlende Effekte werden häufig auf die Kürze der Intervention zurückgeführt. Allerdings führt der hohe und langfristige Aufwand einer Teilnahme dazu, dass gerade die Populationsgruppen nicht untersucht werden, die am meisten von solch einem Ansatz profitieren würden.

Eine weitere multimodale Interventionsstudie, die PreDIVA-Studie (Prevention of Vaskular Dementia by Intensive Care), untersuchte, ob durch eine Kontrolle von kardiovaskulären Risikofaktoren die Demenzinzidenz reduziert werden kann. Bei der Studie handelt es sich um eine auf 6 Jahre angelegte, cluster-randomisierte Studie mit 3500 kognitiv gesunden Teilnehmern im Alter von 70 bis 78 Jahren. Die Studie konnte keine positive Beeinflussung der Gehirngesundheit durch eine Verbesserung der kardiovaskulären Risikofaktoren identifizieren. Die Intervention führte zu keiner Verbesserung der Inzidenz für alle Formen der Demenz und hatte keine Effekte auf die Mortalität, kardiovaskuläre Erkrankungen oder Beeinträchtigungen. Der systolische Blutdruck konnte allerdings in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessert werden (van Charante *et al.* 2016). Die fehlenden positiven Effekte könnten möglicherweise auf eine zu geringe Intensität der vaskulären Intervention zurückzuführen sein. Bei der Studienpopulation handelte es sich außerdem nicht um eine Gruppe mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko. Dies ist auf der einen Seite zwar positiv, da die Studienteilnehmer die Allgemeinbevölkerung widerspiegeln, auf der anderen Seite kann dies aber auch die Ursache für ausbleibende Effekte sein. Eine Assoziation zwischen vaskulären Risikofaktoren und Demenz wurde bisher eher in einem jüngeren Alter (40 bis 60 Jahre) beobachtet. Damit waren die Studienteilnehmer möglicherweise bereits zu alt, um mit einer Kontrolle der kardiovaskulären Risikofaktoren einer Demenz entgegenzuwirken.

Die *Multidomain Alzheimer Preventive Trial* (MAPT)-Studie untersucht ebenfalls einen multimodalen Ansatz zur Prävention von kognitiven Beeinträchtigungen bei gebrechlichen, älteren Probanden (≥ 70 Jahre). Die drei Jahre andauernde Studie mit 1680 Teilnehmern analysierte den Einfluss einer Intervention mit Ernährungsberatung, körperlicher Aktivität und kognitivem Training, eine isolierte Omega-3-Fettsäure-Supplementierung und die Kombination der beiden Ansätze. Beide Interventionsstrategien, alleine oder in Kombination, zeigten keinen signifikanten Effekt auf die kognitiven Beeinträchtigungen bei älteren Probanden mit kognitiven Auffälligkeiten (Andrieu *et al.* 2017). Auch bei dieser Studie könnte das Alter der Probanden, die Ursache für ausbleibende Effekte darstellen. Andere Studien haben gezeigt, dass z. B. eine Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren bereits im mittleren Alter und über mehrere

Jahre erfolgen muss, um zu einer Reduzierung des Risikos für die Alzheimer Erkrankung beizutragen (Laitinen *et al.* 2006; Yassine *et al.* 2017). Zusätzlich zu dem möglicherweise zu hohen Alter war die Intensität der multimodalen Intervention gering und die Adhärenz nahm, vor allem in der multimodalen Gruppe, im Laufe des Studienzeitraums ab.

Die Ergebnisse der Interventionsstudien unterstreichen die methodischen Limitationen, denen die Entwicklung und Implementierung von effektiven Präventionsstrategien unterliegen. Außerdem zeigen sie, dass eine frühzeitige Intervention vor dem Auftreten von Symptomen essentiell ist, um eine Effektivität der Ansätze zu erreichen. Dies bringt allerdings mit sich, dass eine langfristige Beobachtung der Studienteilnehmer über den Studienzeitraum hinaus notwendig ist, um eine Aussage über einen Einfluss auf die Entstehung und Progression einer Alzheimer Erkrankung treffen zu können. Möglicherweise sind auch die Instrumente zur Messung der kognitiven Funktion häufig nicht sensitiv genug, um auch schon kleine Verbesserungen detektieren zu können. Die bisherigen Studien untersuchen nur die Effekte von multimodaler Intervention auf metabolische und kognitive Parameter und nicht welche Mechanismen zur Verbesserung der kognitiven Funktion beitragen bzw. die Entstehung einer Demenz hinauszögern könnten. Es existieren bereits mehrere Studien, die den Einfluss der mediterranen Diät und körperlichen Aktivität auf molekularbiologischer Ebene untersucht haben (siehe 1.4.1 und 1.4.2). So konnte in Tierstudien bereits gezeigt werden, dass sich diätische Faktoren positiv auf die mitochondriale Funktion auswirken (Hagl *et al.* 2014; Hagl *et al.* 2016a; Hagl *et al.* 2016b; Reutzel *et al.* 2018), was wiederum dann die Progression der Demenz verlangsamen könnte. Körperliche Aktivität scheint neurotrophische Faktoren wie das BDNF zu beeinflussen (Pareja-Galeano *et al.* 2013) sowie sich ebenfalls positiv auf die mitochondriale Funktion auszuwirken (Wang *et al.* 2019; Bamidis *et al.* 2014; Bayod *et al.* 2015). Studien, die den Einfluss einer multimodalen Intervention auf diese Parameter untersuchen, sind deshalb essentiell, um Aussagen über mögliche synergistische Effekte treffen zu können sowie potentielle Wirkmechanismen dieser Präventionsstrategien zu erforschen.

2 Zielsetzung

Mit dem stetigen Anstieg der Lebenserwartung und der zunehmenden Alterung der Bevölkerung nehmen auch altersbedingte Erkrankungen immer weiter zu. Hier nehmen neurodegenerative Erkrankungen wie die Demenz, die sich langfristig auf die psychische und physische Funktion ausüben, eine entscheidende Rolle ein. Im Jahr 2015 waren mehr als 47 Millionen Menschen weltweit von einer Demenz betroffen und bis 2050 wird sich die Zahl sogar verdreifachen (Prince et al. 2015). Daraus ergibt sich eine der größten gesundheitsspezifischen Herausforderungen unserer Zeit, da die persönlichen, sozialen und ökonomischen Konsequenzen der Demenz enorm sind. Die häufigste Form der Demenz ist mit Zwei Dritteln die Alzheimer Erkrankung. Ihre Ursachen sind multifaktoriell und reichen von Ablagerungen von A β -Oligomeren und Plaques und NFTs über einen Glucose-Hypometabolismus bis hin zu einer mitochondrialen Dysfunktion.

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Forschung auf die Behandlung der A β -Pathologie konzentriert. Dabei sind A β -Ablagerungen nicht bei allen AD-Patienten vorhanden und alle Medikamente mit diesem Target sind spätestens in Phase-II-Studien gescheitert. Aus diesem Grund rücken neue Targets, wie die mitochondriale Dysfunktion, immer mehr in den Fokus der Forschung. Veränderungen im Energiemetabolismus und der mitochondrialen Funktion lassen sich bereits sehr früh in der AD-Pathologie beobachten. Da eine frühzeitige Diagnostik essentiell ist, verstärkt dies das Interesse an einem potenziellen Biomarker, mit dem alters- oder durch AD bedingte Veränderungen früh nachgewiesen werden können.

Infolgedessen könnte die Messung der mitochondrialen Dysfunktion sowohl für die Diagnostik als auch für die Erforschung von neuen Medikamenten eine entscheidende Rolle spielen. Allerdings ist es schwierig, diese im lebenden Menschen zu messen, da Probenmaterial aus dem Gehirn nicht verfügbar ist und andere, nicht invasive Methoden wie eine Magnetresonanzspektroskopie sehr teuer und aufwendig sind. Hier könnte die Erkenntnis, dass Veränderungen im Energiemetabolismus im Alter und bei der AD nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Peripherie auftreten, von großer Bedeutung sein (Migliore *et al.* 2005; Leuner *et al.* 2012). PBMCs scheinen für die Erforschung der mitochondrialen Funktion in peripheren Geweben besonders geeignet zu sein, da sie nicht nur eine wichtige Rolle in der Immunantwort und dem Metabolismus spielen (Pani *et al.* 2009), sondern sich auch einen Großteil der nicht synaptischen biochemischen Umgebung der Neuronen teilen. Außerdem sind alle epigenetischen Enzyme und Maschinerien in beiden Zelltypen vorhanden (Arosio *et al.* 2014). Zudem sind die Gewinnung und die Messung der mitochondrialen Funktion im PBMCs kostengünstig, minimal invasiv und einfach.

Vor diesem Hintergrund ist das erste Ziel dieser Dissertation, die Methode der Isolation der PBMCs und die anschließende Messung von bioenergetischen Parametern zu etablieren und Einflussfaktoren auf diese zu erforschen und auszuschließen. Nach Abschluss der Etablierung soll mit der Methode untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Funktion in den PBMCs und dem Gehirn bei jungen, gesunden Probanden messbar ist. Sollte dies der Fall sein, könnte die Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs die Situation im Gehirn widerspiegeln und als potenzieller Marker dienen. Hierfür wäre es interessant, herauszufinden, ob auch schon bei gesunden älteren Personen Veränderungen in der mitochondrialen Funktion in PBMCs messbar sind. Zur Erforschung dieser These soll für diese Arbeit eine weitere Studie durchgeführt werden, in der die mitochondriale Funktion von gesunden jungen und älteren Probanden in PBMCs erfasst wird, um mögliche Unterschiede zu identifizieren.

Bei AD Patienten konnten Leuner *et al.* (2007, 2012) in ihrer Studie bereits zeigen, dass die mitochondriale Funktion im Vergleich zu gesunden, gleichaltrigen Probanden beeinträchtigt ist (Leuner *et al.* 2007; Leuner *et al.* 2012). Diese Erkenntnis soll in dieser Arbeit ergänzt werden, indem die mitochondriale Funktion von gesunden alten Probanden und MCI-Patienten miteinander verglichen wird.

Neben diesen altersassoziierten Effekten auf die mitochondriale Funktion soll weiterhin der Einfluss des Geschlechts auf die bioenergetischen Parameter in PBMCs erforscht werden. Mitochondrien werden maternal vererbt und die Literatur beschreibt eine bessere antioxidative Abwehr bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter. Welchen Einfluss dies auf die mitochondriale Funktion in PBMCs hat und wie weit sich dieser im Laufe der Alterung verändert, ist ein weiteres Ziel dieser Forschungsarbeit.

Zum Abschluss soll die etablierte Methode genutzt werden, um die Effekte einer multimodalen, sechsmonatigen Intervention auf die mitochondriale Funktion von MCI-Patienten zu untersuchen. Denn trotz intensiver Erforschung der grundlegenden Ursachen der AD und der Suche nach potenziell effektiven Therapien in den letzten Jahren, existiert bisher keine effektive Therapie, um die AD zu heilen oder die Progression der Erkrankung signifikant zu inhibieren. Aus diesem Grund verschiebt sich der Fokus der Forschung immer mehr in den Bereich der Krankheitsprävention, wobei auch eine Veränderung des Lebensstils vielversprechend sein könnte. Die Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs könnte damit dazu beitragen, den Erfolg von Präventions- und Therapieansätzen einer mitochondrialen Dysfunktion zu erforschen und zu überwachen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Name	Hersteller	Ort, Land
Brutschrank	Midi 40 CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Gefrierschrank (-20°C)	GNP 5255 Index 20A/001	Liebherr International Deutschland GmbH	Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	TSX SERIES with V-DRIVE	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Hamilton-Spritze	Hamilton-Spritze gastight, #1701, #1702, #1705, #1725	Hamilton	Höchst, Deutschland
Kühlschrank (4°C)	3130 Index 20B/001	Liebherr International Deutschland GmbH	Biberach an der Riß, Deutschland
Mehrkanalpipette	Xplorer 300 µL	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<i>Multireader</i>	CLARIOstar	BMG Labtech	Ortenberg, Deutschland
	Viktor X3 2030	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
Nanodrop	Nanodrop One	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Labor Optik	Lancing, GB
Oxygraph	<i>Oxygraph-2K</i>	Oroboros	Innsbruck, Österreich
PCR-Cycler	T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad	München, Deutschland
PCR-Workstation	PCR-Workstation	Fisher Scientific	Hampton, USA
Pipette	Finnpipette® 300 µL	Thermo Electron Corporation (Thermo Scientific)	Waltham, USA
Photometer	Spectrophotometer Genesys 10S UV-Vis	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
pH-Meter	pH Meter HI2210	Hanna Instruments Deutschland GmbH	Vöhringen, Deutschland
Pipette	Research Plus 100-1000 µL	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette	Pipetman P2, P20, P200	Gilson	Limburg, Deutschland
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand	Wertheim, Deutschland
<i>Real-time-PCR-System</i>	CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad	München, Deutschland
Thermomixer	PSC24N Thermo-Shaker	Grant-bio	Cambridgeshire, UK

Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe	Vaccubrand GmbH & Co	Wertheim, Deutschland
Vortex	Vortex-Genie 2®	Scientific Industries	Bohemia, USA
Waage	Präzisionswaage AEJ200-5CM	Kern&Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad	WNB22	Memmert	Schwabach, Deutschland
Wasserfiltrationsanlage	MilliQ Academic	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Zellkultur-Werkbank	MSC Advantage	Thermo Scientific	Waltham, USA
Zellzahlzähler	TC20 Automated Cell Counter	Bio-Rad	München, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific	Waltham, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Name	Hersteller	Ort, Land
96-well Mikrotiterplatten	Microtiterplate white walled (96-well)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
96-well PCR-Platten	Hard-Shell® PCR Plates 96-well, thin wall	Bio-Rad	München, Deutschland
Einmal-Zählkammer für TC20™	Counting slides, dual chamber for cell counter	Bio-Rad	München, Deutschland
Einmalkanüle	Fine-ject® 21Gx1 ½“ Nr.2 0,8x40 mm TW/LB	Henke Sass Wolf	Tuttlingen, Deutschland
Einweghandschuhe	Vasco® Nitril white Größe M	Braun	Melsungen, Deutschland
Einwegspritzen	Injekt® 20 mL, 10 mL, 5 mL	Braun	Melsungen, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blutabnahme-röhrchen	S-Monovette® 2,7; 9 mL K2E-Gel 92x16 mm	Sarstedt AG&Co.	Nürnbrecht, Deutschland
Flächendesinfektion	Bacillol AF	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
Glasküvette	Quarzglasküvette	Sarstedt AG&Co.	Nürnbrecht, Deutschland
Glaspasteurpipetten	Glaspasteurpipetten	Carl ROTH GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
GlucoEXACT- Blutabnehmeröhrchen	S-Monovette® 3,1 ml GlucoEXACT, Citrat Fluorid	Sarstedt AG&Co.	Nürnbrecht, Deutschland
Heparin-Monovetten	S-Monovette® 9 mL LH: 16 I.U./ mL	Sarstedt AG&Co.	Nürnbrecht, Deutschland
Kanülenabwurfbox	Medibox® 3 L	Braun	Melsungen, Deutschland

Konische Zentrifugenröhrchen Leucosep™	Cellstar® tubes 50 mL, 15 mL Leucosep™ tube	Greiner Bio-One Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland Frickenhausen, Deutschland
PCR-Folie	Microseal® B-Adhesive Sealer MSB-1001	Bio-Rad	München, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Saphire PCR-Reaktionsgefäß 0,2 mL	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Ultratip 1000 µL, 200 µL, 10 µL	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Finntip® 1000 µL, 300 µL, 200 µL, 10 µL	Thermo Scientific	Waltham, USA
Plastikpasteurpipetten	Pasteurpipette	VWR	Haasrode, Leuven
Präzisionswischtücher	Kimtech Science tissue	Kimberley-Clark® Professional	Surrey, UK
Reaktionsgefäße	Reaction Tubes 2 mL, 1 mL, 0,5 mL	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten	Cellstar® 50 mL, 25 mL, 10 mL, 5 mL	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Serum Gel-Monovette	S-Monovette® 4,9 mL Z-Gel	Sarstedt AG & Co.	Nürnbrecht, Deutschland
Sekundärröhrchen	SEKUNDÄR Röhrchen MULTIPLEX PP 13x75mm, mit weißem <i>Screw Cap</i>	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Sicherheitsvenen-punktionsbesteck	Multifly®-Kanüle 23G 200 mm lang	Sarstedt AG & Co.	Nürnbrecht, Deutschland

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie oder Lösungen	Hersteller	Ort, Land
100 % Ethanol (EtOH)	Carl ROTH GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
70 % EtOH	selbst angesetzt	
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Acetyl-CoA	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Antimycin A	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Apoprotinin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aqua bidestilliert (Aqua bidest)	selbst hergestellt mit MilliQ Academic	
Biocoll Separating Solution	Biochrom	Berlin, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol (78,13 g/mol)	ITW Reagents	Glenview, USA

Dithionit	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Dithionitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (10x)	Gibco (Thermo Scientific)	Waltham, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
FCCP	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare	Uppsala, Schweden
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glucose	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Glutamat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Harnstoff	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad	München, Deutschland
K-Lactobionat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH), 5 N	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Malat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH), 1 N; 0,1 N	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid (TMPD)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Oligomycin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Oxalacetat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Invitrogen	Waltham, USA
Pepstatin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
PMSF	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Pyruvat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
RNAprotect® Cell Reagent	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNAse freies Wasser	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt, Deutschland
Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium (RPMI)	Gibco (Thermo Scientific)	Waltham, USA
Rotenon	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl), 37 %	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl), 1 N; 0,1 N	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Succinat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Sucrose	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triethanolamin Sigma-Aldrich, Steinheim, D	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

3.1.4 Kits

Kit	Hersteller	Ort, Land
iScript™ cDNA-Synthesis Kit	Invitrogen (Thermo Scientific)	Waltham, USA
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Turbo DNA-free TM-Kit	Thermo Scientific	Waltham, USA
ViaLight™ plus	Lonza	Walkersville, USA

3.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Für die Herstellung aller Puffer, Lösungen und Medien wurde Reinstwasser verwendet (Milli-Q, Millipore, Billerica, USA), welches nachfolgend als H₂O bezeichnet wird.

DPBS (1x)

Zu 900 ml H₂O wurden 100 ml DPBS (10x) gegeben.

MiR05

Finale Konzentration

EGTA 0,5 mM	0,19 g/l	0,5 mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,61 g/l	3 mM
K-Lactobionat	120 ml 0,5 M K-Lactobionat- Stock*	60 mM
Taurin	2,50 g/l	20 mM
KH ₂ PO ₄	1,36 g/l	10 mM
HEPES	4,77 g/l	20 mM
Sucrose	37,65 g/l	110 mM
BSA	1 g/l	

Die Substanzen wurden in H₂O gelöst und auf pH 7,1 bei 30°C mit 5 N KOH eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in 20 ml Aliquots.

*Für den 0,5 M K-Lactobionat-Stock wurden 35,83 g K-Lactobionat in 100 ml H₂O gelöst und nach Einstellung mit KOH auf pH 7,0 mit H₂O auf ein Volumen von 200 ml aufgefüllt.

Lysispuffer

Zur Herstellung des Lysispuffers II wurde zunächst ein Lösungspuffer (Lysispuffer I) angesetzt. Dazu wurden 73 mg EDTA (1mM), 0,5% Triton x 100 und 52,5 mg Natriumfluorid (5mM) in 250 ml PBS (1x) gelöst. Für den Lysispuffer II werden 36 g Harnstoff (6M), 66,5mg Natriumpyrophosphat (2,5mM), 18,9 mg Natriumorthovanadat, 0,5 g Natriumdesoxycholat (0,5%) und 0,5 g Natriumdodecylsulfat (0,5%) in 100 ml des Lysispuffer I gelöst.

Am Tag der Messung werden folgende Substanzen zu 10 ml des Lysispuffer II gegeben:

17,6 µl Aprotinin	1,7 mg/ml
20 µL Leupeptin	5 mg/ ml
20 µL Pepstatin	5 mg/ ml
10 µL PMSF	100 mM

Reaktionsmedium zur Messung der Citratsynthase-Aktivität

Zur Herstellung des Reaktionsmediums wurden zunächst Puffer hergestellt. Es wurden 2,42 g TRIS/20 ml H₂O gelöst und mit 37 % HCl auf pH 8,1 eingestellt, um einen 1,0 M TRIS-HCl-Puffer zu erhalten. Weiterhin wurde ein 0,5 M Triethanolamin-HCl-Puffer aus 8,06 g Triethanolamin/100 ml H₂O hergestellt, mit 37 % HCl auf pH 8,0 eingestellt und mit 202,24 mg EDTA supplementiert. Die Puffer wurden bei 4°C gelagert. Acetyl-CoA wurde in H₂O gelöst, um eine Konzentration von 12,2 mM zu erhalten und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Am Tag der Messung wurde der 0,5 M Triethanolamin-HCl-Puffer 1:5 mit H₂O verdünnt und die Komponenten des Reaktionsmediums hergestellt:

Finale Konzentration

DTNB	4 mg/10 ml 0,1 M TRIS-HCl- Puffer	1,01 mM
------	--------------------------------------	---------

Triton X-100	10 g/90 ml H ₂ O	10%
Oxalacetat	6,6 mg/5 ml 0,1 M Triethanolamin-HCl Puffer	10 mM
Acetyl-CoA		12,2 mM

Trypanblau-Lösung

Für eine 0,4% Trypanblau-Lösung wurden 100 mg Trypanblau in 100 ml PBS gelöst.

Zellkulturmedium für isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs)

Roswell-Park-Memorial-Medium (RPMI)	500 ml
FCS, inaktiviert	10 ml
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

3.1.6 Primer für die quantitative real-time PCR

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)	Hersteller	Ort, Land
<i>ACTB</i>	Fwd: GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG Rvs: AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	234	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>ATP5D</i>	Fwd: GGA AGC TCC TCC TCA GCT TT Rvs: CAG GCT TCC GGG TCT TTA AT	198	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>CAT</i>	Fwd: ACT TCT GGA GCC TAC GTC CT Rvs: CGC ATC TTC AAC AGA AAG GT	200	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>COX5A</i>	Fwd: GCA TGC AGA CGG TTA AAT GA Rvs: AGT TCC TCC GGA GTG GAG AT	152	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>CREB1</i>	Fwd: TGG AGT TGT TAT GGC ATC CT Rvs: ATT TTC AAG CAC TGC CAC TC	169	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>CS</i>	Fwd: CCA TCC ACA GTG ACC ATG AG Rvs: CTT TGC CAA CTT CCT TCT GC	186	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>GAPDH</i>	Fwd: GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT Rvs: TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG	238	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>GPx1</i>	Fwd: GCT TCC AGA CCA TTG ACA TC Rvs: GTG TTC CTC CCT CGT AGG TT	170	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>K1</i>	Fwd: CGC CAC CTA GCG TCT CTA TC Rvs: TGA AAA TCC GGT CTT CAT CC	213	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>NRF1</i>	Fwd: GTA ACC CTG ATG GCA CTG TC Rvs: TCT GGA TGG TCA TCT CAC CT	183	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>PGK1</i>	Fwd: CTG TGG GGG TAT TTG AAT GG Rvs: CTT CCA GGA GCT CCA AAC	198	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>SIRT1</i>	Fwd: TGT GGT AGA GCT TGC ATT GA Rvs: GCC TGT TGC TCT CCT CAT TA	153	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>SOD</i>	Fwd: TGT CAC CCA GTG GTT TTT GT Rvs: GCC CTG CAA ATA AAC ATC CT	152	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland
<i>TFAM</i>	Fwd: TCC CCC TTC AGT TTT GTG TA Rvs: ATC AGG AAG TTC CCT CCA AC	189	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland

ACTB β -Actin *CAT* Catalase *CREB1* cAMP response element-binding protein *CS* Citratsynthase *K* Komplex *GPX1* Glutathionperoxidase 1 *NRF1* Nuclear respiratory factor 1 *SIRT1* Sirtuin 1 *SOD* Superoxidismutase *TFAM* mitochondrial transcription factor A

3.2 Methoden

3.2.1 Konzeption der klinischen Studien

Im folgenden Kapitel werden die Ziele, der Aufbau und Ablauf sowie die untersuchten Probandenkollektive, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien, beschrieben.

3.2.1.1 Einfluss unterschiedlicher Zentrifugenröhrchen auf die Effektivität und Reinheit der Isolation von PBMCs und die mitochondriale Funktion

In dieser Studie sollte der Einfluss der Verwendung von unterschiedlichen Zentrifugenröhrchen (herkömmliche *Falcons* vs. *Leucosep*TM) auf die Effektivität und Reinheit der Isolation sowie auf die mitochondriale Funktion untersucht werden. Das Studiendesign (siehe **Abbildung 3.1**) wurde von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen geprüft und bestätigt (Referenz AZ 140/17) und die Studie wurde unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki (Fortaleza 2012) durchgeführt. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren ein bekannter Eisenmangel, Schwangerschaft oder Stillzeit, Hämophilie oder Hämatophobie oder die Einnahme von Antikoagulanzen. Alle Probanden wurden vor den Untersuchungen über das Vorhaben und die Experimente aufgeklärt und erklärten sich schriftlich damit einverstanden.

Zwei jungen weiblichen Probanden (siehe **Tabelle 3.1**) wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen vier Röhrchen Blut entnommen. Die Blutabnahme erfolgte immer zur gleichen Uhrzeit und im nüchternen Zustand. Für die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ), die der Auftrennung des Blutes in die verschiedenen Bestandteile dient (siehe **Abbildung 3.1**), wurde entweder ein herkömmliches Falcon oder ein spezielles Falcon mit poröser Trennschicht (*Leucosep*TM) genutzt.

Nach der Isolation wurde die Anzahl der isolierten PBMCs bestimmt, sowie die mitochondriale Funktion mit Hilfe der ATP-Konzentrationen und der Messungen der mitochondrialen Komplexaktivität ermittelt.

An zwei zusätzlichen Tagen wurden zudem nochmals sechs Röhrchen Blut abgenommen, um die Reinheit der Isolation mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen. Die Durchflusszytometrie wurde von Dr. Nelli Baal (Core Facility, Universität Gießen) durchgeführt.

Tabelle 3.1 Falcon vs. Leucosep™ - Demographische Daten.

Probanden	Frauen <i>n</i> =2
Alter [Jahre]	25,5±0,5
Gewicht [kg]	60,5±0,78
Größe [m]	1,76±0,01
Raucher (<i>n</i>)	0

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; ns=Altersunterschied ist nicht signifikant ($p=0,17$).

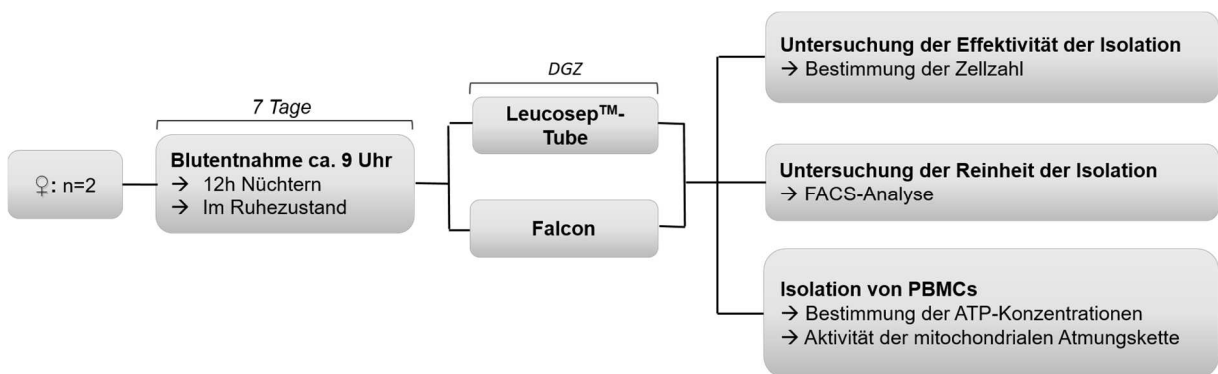


Abbildung 3.1 Studiendesign der Studie Falcon vs. Leucosep™. Zwei weiblichen Probanden wurde an sieben aufeinanderfolgenden Tagen Vollblut entnommen. Aus dem Blut wurden unter Verwendung von herkömmlichen Falcons oder den speziellen Zentrifugenröhrchen Leucosep™ die PBMCs isoliert. Anschließend wurden die Proben auf die Effektivität und Reinheit der Isolation untersucht, um zu identifizieren welches der zwei untersuchten Röhrchen besser geeignet ist. Zur Ergänzung dieser Erkenntnisse wurde der Einfluss der unterschiedlichen Materialien auf die anschließend folgenden Messungen der mitochondrialen Funktion analysiert. DGZ=Dichtegradientenzentrifugation, FACS=fluorescence-activated cell sorting, PBMC=periphere mononukleäre Blutzellen.

3.2.1.2 Untersuchung des Einflusses von Melatonin auf die Messung der mitochondrialen Funktion

Zur Untersuchung des chronobiologischen Einflusses des Hormons Melatonin auf die mitochondriale Funktion in PBMC wurde zehn weiblichen und zehn männlichen Probanden an drei aufeinanderfolgenden Tagen um 8 Uhr und um 14 Uhr Blutproben entnommen. Die Abnahme der Melatonin-Spiegel beginnt in der Regel bereits um 6 Uhr (siehe **1.3.3.1**). Da Blutabnahmen für Forschungszwecke meistens gegen 8 Uhr stattfinden, wurde diese Uhrzeit als Zeitpunkt 1 gewählt. Als Zeitpunkt 2 wurde die Uhrzeit 14 Uhr gewählt, da um diese Uhrzeit nur noch minimale bzw. basale Konzentrationen an Melatonin vorliegen sollten. Das Studiendesign (siehe **Abbildung 3.2**) wurde von der Ethikkommission des medizinischen Fachbereiches der Justus-Liebig-Universität geprüft und bestätigt (Referenz AZ 140/17) und die Studie wurde unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki (Fortaleza 2012) durchgeführt. Aus-

schlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren ein bekannter Eisenmangel, Schwangerschaft oder Stillzeit, Hämophilie oder Hämatophobie, die Einnahme von Antikoagulanzen sowie eine Blutspende in den letzten acht Wochen vor Studienbeginn. Probanden mit Auffälligkeiten in der Hämatologie wurden aus der Studie ausgeschlossen (siehe **Tabelle 3.3**). Alle Probanden wurden vor den Untersuchungen über das Vorhaben und die durchgeführten Untersuchungen aufgeklärt und erklärten sich schriftlich damit einverstanden.

Die Blutabnahmen wurden vom Personal der Blutbank Gießen durchgeführt. Jedem Probanden wurde um ca. 8 Uhr nach zwölfstündigem Fasten und im Ruhezustand 45 ml Vollblut entnommen. Davon wurden eine EDTA-Monovette zur Erstellung eines Blutbildes mit einem Sysmex-Hämatologiesystem genutzt, eine Serum-Gel-Monovette zur Gewinnung des Serums für die Bestimmung der Melatoninkonzentration (siehe **3.2.9**) verwendet und vier Heparin-Monovette zur Isolation der PBMCs (siehe **3.2.2**) eingesetzt. Am Nachmittag wurde die gleiche Menge an Blut und Röhrchen abgenommen. Auf die EDTA-Monovette zur Erstellung eines Blutbildes wurde zu diesem Zeitpunkt verzichtet. Nach der ersten Blutabnahme bekamen alle Probanden eine standardisierte Studienmahlzeit (Vollkornbrötchen mit wahlweise Käse oder Salami). Nach Verzehr der standardisierten Mahlzeit durften die Probanden bis zur zweiten Blutabnahme um 14 Uhr keine weiteren Lebensmittel oder Getränke, mit Ausnahme von Wasser, verzehren. Dadurch wurde eine sechsstündige Fastenzeit gewährleistet. Das Probandenkollektiv musste während der Studie auf schwere körperliche Arbeit und Sport verzichten.

Außerdem wurde unter Verwendung des Munich ChronoType Questionnaire (MCTQ) (siehe **3.2.8**) das Schlafverhalten der Probanden in den letzten zwei bis drei Monaten vor Beginn der Studie erfasst sowie in der Nacht vor jedem Studientag.

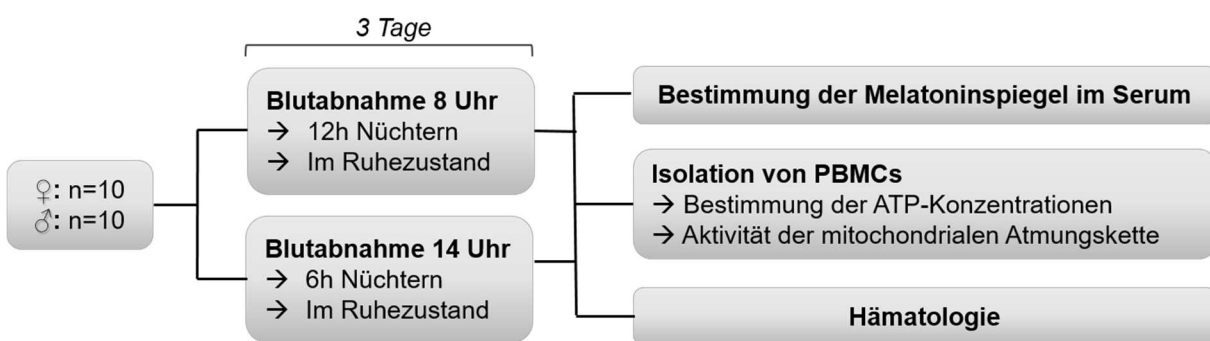


Abbildung 3.2 Studiendesign Melatonin-Studie. Zehn gesunden Frauen und Männern wurde an drei aufeinander folgenden Tagen am Morgen (8 Uhr, 12h nüchtern, im Ruhezustand) und am Nachmittag (14 Uhr, 6h nüchtern, im Ruhezustand) Blut abgenommen. Nach der Abnahme wurden die PBMCs mittels DGZ isoliert und es wurden die ATP- Spiegel bestimmt sowie die mitochondriale Komplexaktivität gemessen. Das aus dem Blut gewonnene Serum wurde für die spätere, externe Bestimmung der Melatoninspiegel bei -80°C weggefroren. Weiterhin wurde das Blut auf Abnormalitäten in der Hämatologie untersucht. DGZ=Dichtegradientenzentrifugation, PBMC=periphere mononukleäre Blutzellen.

Allgemeine und anthropometrische Daten wie Alter, Geschlecht, BMI sowie chronische Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen wurden mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Anhang) erfasst.

Tabelle 3.2 Melatonin-Studie - Demographische Daten.

Probanden	Frauen <i>n=10</i>	Männer <i>n=10</i>
Alter [Jahre]	24,6±1,19 ^{ns}	26,7±0,9
Gewicht [kg]	60,78±1,67	82,7±1,68
Größe [m]	1.69±0.02	1.85±0.03
BMI [m]	21,23±1,85	24,32±2,70
Raucher (n)	0	0

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; ns=Altersunterschied ist nicht signifikant ($p=0,17$).

Tabelle 3.3 Melatonin-Studie - Hämatologie.

	Frauen <i>n=10</i>	Männer <i>n=10</i>
Hämoglobin [g/dl]	13,52±0,16	14,51±0,2
WBC [$10^3/\mu\text{L}$]	5,53±0,22	6,13±0,22
RBC [$10^6/\mu\text{L}$]	4,45±0,06	4,98±0,07
PLT [$10^6/\mu\text{L}$]	257,8±11,48	228,7±7,2

Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Tagen ±SEM; WBC Weiße Blutzellen RBC Rote Blutzellen PLT Blutplättchen.

3.2.1.3 Etablierung von Biomarkern zur Erfassung des peripheren und zerebralen Energiemetabolismus (PECEME)

In dieser Pilotstudie sollte untersucht werden, ob die mitochondriale Funktion in PBMCs mit zerebralen Energiemetaboliten korreliert. Außerdem sollten mögliche geschlechtsassoziierte Unterschiede in der peripheren und zerebralen mitochondrialen Funktion identifiziert werden. Die Studie wurde in Kooperation mit Mitarbeitern der Goethe Universität Frankfurt vom Institut für Neuroradiologie, dem Institut für Allgemeinmedizin sowie Institut für Psychiatrie, Psychosomatische Medizin und Psychotherapie durchgeführt. Das Studiendesign (siehe auch **Abbildung 3.3**) wurde von der Ethikkommission der Goethe Universität Frankfurt geprüft und bestätigt (Referenz 45/16) und die Studie wurde unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki (Fortaleza 2012) durchgeführt. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren Herzschrittmacher, Neurostimulatoren oder Medikamentenpumpen, Metallteile im Körper, Platzangst, ein bekannter Eisenmangel, Schwangerschaft oder Stillzeit, Hämophilie oder Hä-

matophobie und die Einnahme von Antikoagulanzen. Alle Probanden wurden vor den Untersuchungen über das Vorhaben und die durchgeführten Untersuchungen aufgeklärt und erklärten sich schriftlich damit einverstanden.

Für die Studie wurden 30 Probanden rekrutiert. Aufgrund einer Hämatophobie zogen sechs männliche Probanden ihr Einverständnis für die Teilnahme zurück. Somit wurden 24 junge Probanden (15 Frauen und 9 Männer) in die Studie eingeschlossen. Bei allen Probanden wurde im Brain Imaging Center in Frankfurt zur Erfassung der Hirnstruktur und Bestimmung cerebraler Energiemetaboliten (wie N-Acetylaspartate (NAA)) eine MR-Untersuchung durchgeführt. Vor oder nach der MR-Untersuchung wurden den Probanden 36 ml Blut in EDTA-K2-Monovetten abgenommen. Die Blutproben wurden zur Isolation der PBMCs mittels DGZ genutzt und anschließend wurde in diesen die mitochondriale Aktivität sowie die ATP-Spiegel bestimmt. Weiterhin wurde die Genexpression von Genen der mitochondrialen Biogenese sowie antioxidativen Enzymen mittels quantitativer *real-time* PCR in den isolierten Zellen untersucht.

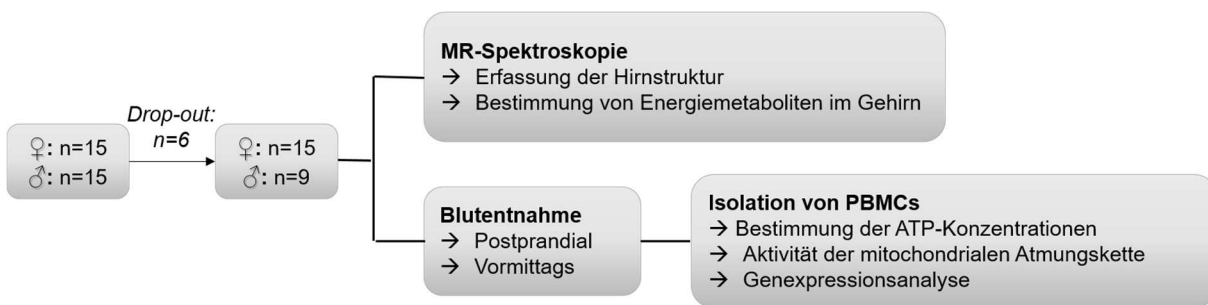


Abbildung 3.3 Studiendesign PECEME-Studie. Für die Studie wurden 30 Probanden rekrutiert. Es wurden 15 gesunde Frauen und 9 gesunde Männer in die Studie eingeschlossen. Bei allen Probanden wurde im Brain Imaging Center in Frankfurt zur Erfassung der Hirnstruktur und Bestimmung cerebraler Energiemetaboliten eine MR-Untersuchung durchgeführt. Vor oder nach der MR-Untersuchung wurde den Probanden 36 ml Blut entnommen und die Blutproben wurden zur Isolation der PBMCs mittels DGZ genutzt. Anschließend wurden in diesen die mitochondriale Aktivität sowie die ATP-Spiegel bestimmt. Weiterhin wurde die Genexpression von Genen der mitochondrialen Biogenese sowie antioxidativen Enzymen mittels quantitativer *real-time* PCR untersucht.

Allgemeine und anthropometrische Daten wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und der Waist-Hip-Ratio (WHR, Verhältnis des Taillen- und Hüftumfangs) (siehe **Tabelle 3.4**) sowie chronische Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen wurden mit Hilfe eines Fragebogens erfasst.

Tabelle 3.4 PECEME-Studie - Demographische Daten.

Probanden	Frauen <i>n=15</i>	Männer <i>n=9</i>
Alter [Jahre]	31,1±1,8 ^{ns}	30,2±2,4
Gewicht [kg]	63,0±3,2	86,0±3,5
Größe [m]	1,69±0,01	1,82±0,01
BMI [m]	22±1,1	26±1,1
Waist-Hip-Ratio (WHR)	0,78±0,01	0,83±0,03
Raucher (n)	2	0

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; ns=Altersunterschied ist nicht signifikant ($p=0,77$).

3.2.1.4 Etablierung von Biomarkern zur Erfassung des peripheren und zerebralen Energiemetabolismus im Alter (PECEMA)

Zur weiteren Erforschung und Bestätigung der Erkenntnisse aus der PECEME-Studie sollten im Rahmen dieser Studie die gleichen Untersuchungen mit einer höheren Probandenzahl durchgeführt werden. Neben der Korrelation der mitochondrialen Parameter im Blut und im Gehirn sollte außerdem analysiert werden, ob altersassoziierte Unterschiede in der peripheren und zerebralen mitochondrialen Funktion zwischen jungen und alten gesunden Probanden existieren. Die Studie wurde in Kooperation mit Mitarbeitern der Goethe Universität Frankfurt vom Institut für Neuroradiologie und dem Institut für Allgemeinmedizin durchgeführt. Das Studiendesign (siehe **Abbildung 3.4**) wurde von der Ethikkommission der Goethe Universität Frankfurt geprüft und bestätigt (Referenz 45/16) und die Studie wurde unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki (Fortaleza 2012) durchgeführt. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren Herzschrittmacher, Neurostimulatoren oder Medikamentenpumpen, Metallteile im Körper, Platzangst, Schlaganfall, Demenz, ein bekannter Eisenmangel, Schwangerschaft oder Stillzeit, Hämophilie oder Hämatophobie. Alle Probanden wurden vor den Untersuchungen über das Vorhaben und die durchgeführten Untersuchungen aufgeklärt und erklärten sich schriftlich damit einverstanden.

In die Studie sollten insgesamt 120 Probanden (je 30 Frauen und Männer im Alter von 20 bis 35 und 65 bis 85 Jahren) eingeschlossen werden. 136 Probanden nahmen schlussendlich an der Studie teil. 6 Probanden mussten aus gesundheitlichen Gründen von der Studienteilnahme zurücktreten, sodass 130 Probanden untersucht wurden. Bei allen Probanden wurde zunächst im Brain Imaging Center in Frankfurt 54 ml Blut abgenommen. Im Anschluss wurde zur Erfassung der Hirnstruktur und Bestimmung zerebraler Energiemetaboliten (wie NAA) eine MR-Untersuchung durchgeführt. Die Blutproben wurden zur Isolation der PBMCs mittels DGZ genutzt und anschließend in diesen die mitochondriale Aktivität sowie die ATP-Spiegel bestimmt. Ein Teil der Blutproben wurde für ein Differentialblutbild, für die Bestimmung der Blutzucker

und Cholesterinwerte und die Messung des Omega-3-Indexes an externe Dienstleister (Labordiagnostik, Frankfurt; Omegamatrix, München) weitergegeben. Da an der Studie nur kognitiv gesunde Probanden teilnehmen sollten, wurden zudem noch neuropsychologische Testungen durchgeführt. Bei den Probanden im Alter von 20 bis 35 Jahren wurde der Mini Mental Status Test (MMST) verwendet, bei den älteren Probanden der ausführlichere CERAD-Test durchgeführt. Probanden mit auffälligen Testergebnissen wurden im Nachhinein aus der Studie ausgeschlossen. Die Ergebnisse der kognitiven Testung sowie der MRS sind nicht Teil dieser Arbeit.

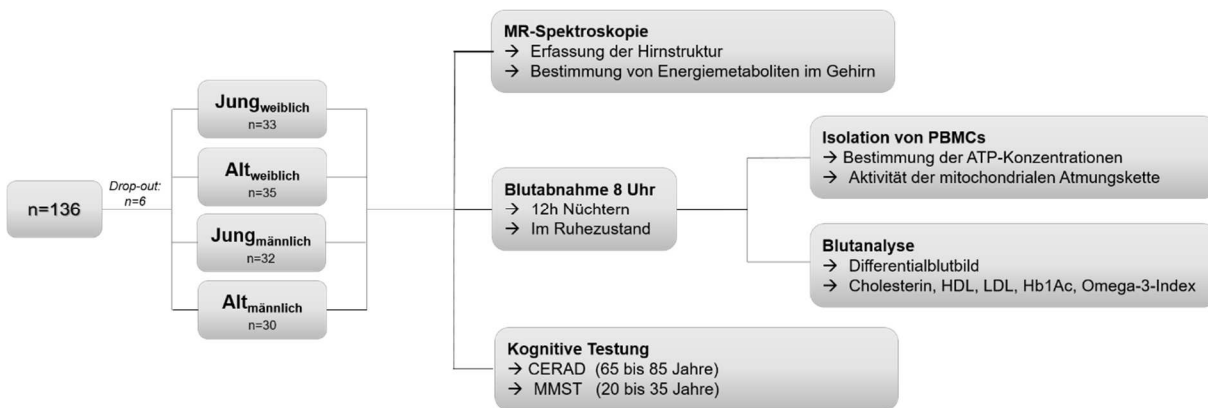


Abbildung 3.4 Studiendesign PECEMA-Studie. In die Studie sollten insgesamt 120 Probanden (je 30 Frauen und Männer im Alter von 20 bis 35 und 65 bis 85 Jahren) eingeschlossen werden. 136 Probanden nahmen schlussendlich an der Studie teil. 6 Probanden mussten aus gesundheitlichen Gründen von der Studienteilnahme zurücktreten, sodass 130 Probanden untersucht wurden. Bei allen Probanden wurden zunächst 54 ml Blut abgenommen. Im Anschluss wurde zur Erfassung der Hirnstruktur und Bestimmung cerebraler Energiemetaboliten eine MR-Untersuchung durchgeführt. Die Blutproben wurden zur Isolation der PBMCs mittels DGZ genutzt und anschließend in diesen die mitochondriale Aktivität sowie die ATP-Spiegel bestimmt. Ein Teil der Blutproben wurde für ein Differentialblutbild, für die Bestimmung der Blutzucker und Cholesterinwerte und die Messung des Omega-3-Indexes an externe Dienstleister weitergegeben. Bei den Probanden im Alter von 20 bis 35 Jahren wurde der Mini Mental Status Test (MMST) verwendet, bei den älteren Probanden der ausführlichere CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) -Test durchgeführt.

Allgemeine und anthropometrische Daten wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und der Waist-Hip-Ratio (WHR, Verhältnis des Taillen- und Hüftumfangs) (siehe **Tabelle 3.5**) sowie chronische Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen wurden mit Hilfe eines Fragebogens erfasst. Die Ergebnisse der Blutanalyse sind in **Tabelle 3.6** zusammengefasst.

Tabelle 3.5 PECEMA-Studie - Demographische Daten.

Probanden	Frauen n=68		Männer n=62	
	Jw n=33	Aw n=35	Jm n=32	Am n=30
Alter [Jahre]	25,64±0,71*	70,26±1,62 ^{ns}	27,56±0,63*	71,70±1,14 ^{ns}
Gewicht [kg]	66,59±2,32	69,97±1,96	80,80±1,77	80,74±3,55
Größe [m]	1,69±0,01	1,64±0,01	1,84±0,01	1,76±0,01
BMI [m]	23,37±0,82	26,05±0,76	23,96±0,41	26,16±1,28
Waist-Hip-Ratio (WHR)	0,75±0,01	0,83±0,01	0,84±0,02	0,95±0,02
Raucher (n)	2	4	6	3

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; ns=Altersunterschied ist nicht signifikant ($p=0.48$); * = Altersunterschied signifikant ($p=0.048$).

Tabelle 3.6 PECEMA-Studie - Hämatologie.

Probanden	Frauen n=68		Männer n=62	
	Jw n=33	Aw n=35	Jm n=32	Am n=30
WBC [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	6,35±0,23	5,65±0,25	5,46±0,23	6,15±0,42
RBC [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	4,38±0,05	4,55±0,06	4,29±0,07	4,87±0,08
HGB [g/dl]	13,05±0,13	13,71±0,14	15,01±0,17	15,01±0,22
HCT [%]	38,60±0,41	40,45±0,51	43,48±0,44	56,90±12,98
MCV [fL]	88,28±0,86	89,04±0,72	86,01±0,74	90,44±0,80
MCH [pg]	23,85±0,29	30,25±0,29	29,70±0,30	30,93±0,35
MCHC [g/dl]	33,85±0,16	33,98±0,21	34,54±0,25	34,18±0,25
RDW [%]	12,79±0,18	13,11±0,14	12,75±0,17	13,14±0,12
PLT [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	254,6±9,99	247±9,36	218,2±8,41	204,6±9,25
LYM [%]	32,33±1,47	30,97±1,27	34,87±1,09	31,35±1,75
Neutrophile [%]	56,72±1,65	56,88±1,56	52,24±1,05	53,54±1,85
Monozyten [%]	7,86±0,27	8,38±0,34	8,97±0,40	9,62±0,53
Eosinophile [%]	2,23±0,25	2,99±0,30	3,07±0,28	3,84±0,43
Basophile [%]	0,78±0,07	0,75±0,06	0,82±0,06	0,76±0,05
Glucose [mg/dl]	98,42±1,68	105,8±1,93	98,72±1,57	108,0±1,61
CRP[mg/dl]	3,66±0,85	3,12±0,56	2,08±0,77	3,32±0,88
Cholesterin [mg/dl]	185,2±6,78	230,0±5,47	166,7±5,47	202,3±7,70
HDL [mg/dl]	69,94±2,86	72,15±2,43	61,22±2,54	57,67±2,62
LDL [mg/dl]	114,8±6,44	159,10±5,5	104,40±5,30	138,40±7,5
Triglyceride [mg/dl]	87,82±7,40	111,00±8,60	82,25±5,0	116,10±6,93

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; CRP C-reaktives Protein; HCT Hämatokrit HDL High density lipoprotein HGB Hämoglobin LDL low density lipoprotein LYM Lymphozyten MCH mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt MCHC mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration MCV mittleres korpuskuläres Volumen PLT Blutplättchen RBC Rote Blutzellen RDW red cell distribution width WBC Weiße Blutzellen.

3.2.1.5 Multimodale Alzheimer Präventionsstudie: Entwicklung multinationaler Strategien (MIND AD_{MINI}-Studie)

Bei dieser Studie handelt es sich um eine 6-monatige, randomisiert kontrollierte, multizentrale Studie mit Patienten mit milden kognitiven Beeinträchtigungen (MCI), die vom Karolinska Institut in Stockholm initiiert wurde. Insgesamt sollten 150 Probanden an vier verschiedenen Studienzentren in verschiedenen Ländern (Schweden, Finnland, Deutschland und Frankreich) rekrutiert und randomisiert werden. Das Studienteam in Deutschland am Standort in Frankfurt bestand aus Mitarbeitern des Instituts für Allgemeinmedizin und dem Institut für Sportwissenschaften der Goethe Universität Frankfurt sowie dem Institut für Ernährung in Prävention und Therapie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Das Studiendesign orientierte sich an dem zentralen Studienprotokoll aus Schweden und wurde geringfügig modifiziert. Das modifizierte Studiendesign (siehe auch **Abbildung 3.5**) wurde von der Ethikkommission der Goethe Universität Frankfurt geprüft und bestätigt (Referenz 46/18) und die Studie wurde unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki (Fortaleza 2012) durchgeführt. Einschlusskriterien waren die Diagnose einer milden kognitiven Beeinträchtigung (MCI), definiert durch episodische Gedächtnisstörungen und einer grundlegenden AD Pathologie, ein Mini Mental Status Test (MMST)- Score unter bzw. bei 24 und ein ungesunder Lebensstil (weniger als zweieinhalb Stunden Sport in der Woche und geringer Obst- und Gemüsekonsum). Eine Teilnahme war nicht möglich, wenn eine diagnostizierte Demenz nach der DSM-IV (Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders), eine schwere Depression nach DSM-IV oder andere schwere Erkrankungen vorlagen. Alle Probanden wurden vor den Untersuchungen über das Vorhaben und die durchgeführten Untersuchungen aufgeklärt und erklärten sich schriftlich damit einverstanden.

Das primäre Ziel auf internationaler Ebene war die Realisierbarkeit einer solch komplexen multimodalen Intervention sowie die Einhaltung der Interventionskomponenten und der gesunden Lebensstilveränderungen. Als sekundäres Ziel sollte der Einfluss der 6-monatigen Intervention auf vaskuläre und metabolische Risikofaktoren, die gesundheitsbezogene Lebensqualität und physische Leistung analysiert werden. Diese Ergebnisse wurden überwiegend vom Institut für Allgemeinmedizin und Sportwissenschaften erfasst und sind nicht Teil dieser Arbeit. Als zusätzliches Ziel wurde vom Studienteam in Deutschland der Einfluss der multimodalen Intervention auf die mitochondriale Funktion in PBMCs untersucht. Insgesamt wurden 30 Probanden rekrutiert. Nach dem Screening-Termin wurden 6 Probanden von der Studie ausgeschlossen, da sie die Einschlusskriterien nicht erfüllten. In die Studie wurden damit 24 Probanden (15 Frauen, 9 Männer) eingeschlossen und nach dem ersten Messtermin (*Visit 1*) randomisiert in drei gleichgroße Gruppen aufgeteilt (siehe **Tabelle 3.7**). Nach dem *Visit 1* folgte eine

sechsmonatige Interventionsphase (genauer Ablauf siehe **Abbildung 3.5**). Während der Intervention mussten zwei Probanden (weiblich, Lifestyle-Gruppe) die Studienteilnahme aufgrund von nicht interventionsbedingten unerwünschten Ereignissen (UE) beenden, sodass die Studie von 22 Probanden mit Besuch des zweiten Messtermins (*Visit 2*) abgeschlossen wurde.

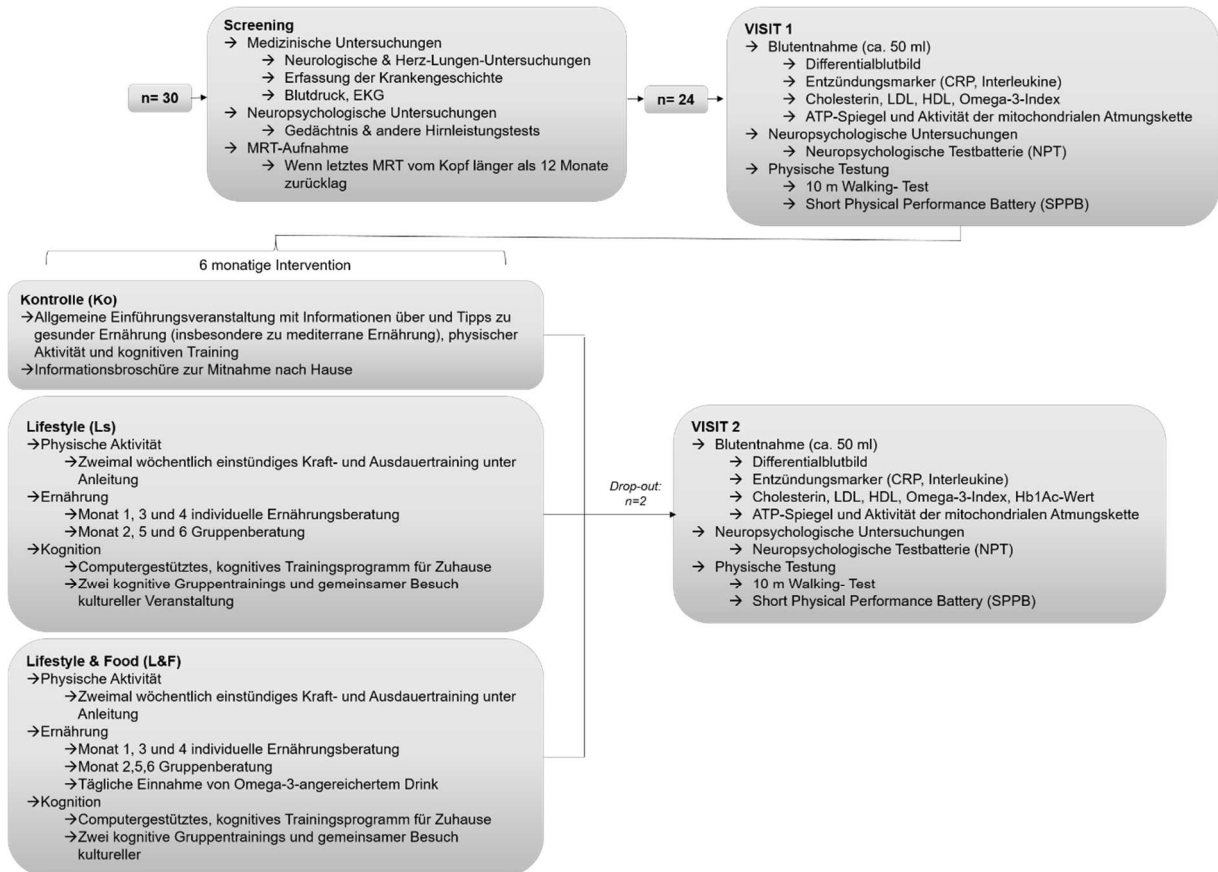


Abbildung 3.5 Studiendesign MIND AD_{MINI}-Studie. Für die Studie wurden 30 Probanden mit milden kognitiven Beeinträchtigungen rekrutiert. Nach dem Screening-Termin mit medizinischen und neuropsychologischen Untersuchungen (ggf. noch Bildgebung des Gehirns) wurden 6 Probanden ausgeschlossen. In die Studie wurden damit 24 Probanden eingeschlossen (15 Frauen, 9 Männer). Nach dem Visit 1 wurden die Probanden randomisiert in die drei Gruppen Kontrolle, Lifestyle und Lifestyle&Food, eingeteilt. Nach der 6-monatigen Intervention fand der Visit 2 statt, an dem die gleichen Parameter wie beim Visit 1 erhoben wurden. Zwei Probanden mussten die Studie aufgrund von nicht interventionsbedingten unerwünschten Ereignissen (UE) vorzeitig beenden.

Allgemeine und anthropometrische Daten wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht (siehe **Tabelle 3.7**) sowie chronische Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen wurden mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Anhang) erfasst. Die Ergebnisse des Differentialblutbildes sind in **Tabelle 3.8** zusammengefasst. Die weiteren Blutwerte können dem Anhang entnommen werden.

Tabelle 3.7 MIND AD_{mini}-Studie - Demographische Daten (Visit 1).

Probanden	Frauen n = 15			Männer n = 9		
	Ko n=5	Ls n=6	L&F n=4	Ko n=3	Ls n=2	L&F n=4
Alter [Jahre]	76,8±1,53 ^{ns}	77±1,75 ^{ns}	72±3,34 ^{ns}	77,3±5,55 ^{ns}	69,5±5,50 ^{ns}	73±4,42 ^{ns}
Gewicht [kg]	NA	72,8±8,97	65,5±5,42	NA	79,2±4,15	95,8±7,65
Größe [m]	NA	1,62±0,04	1,63±0,03	NA	1,81±0,03	1,79±0,02
BMI [kg/m ²]	NA	29,04±2,68	24,98±2,45	NA	23,94±0,94	29,83±1,87
WHR	NA	0,91±0,06	0,84±0,05	NA	0,98±0,05	1,04±0,04
Raucher (n)	0	0	0	0	0	0

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; ns=Altersunterschied ist nicht signifikant, NA=Datensatz nicht vorhanden. Ko Kontrolle Ls Lifestyle L&F Lifestyle&Food.

Tabelle 3.8 MIND AD_{mini}-Studie - Hämatologie (Visit 1).

Probanden	Frauen n = 15			Männer n = 9		
	Ko n=5	Ls n=6	L&F n=4	Ko n=3	Ls n=2	L&F n=4
WBC [x10 ⁹ /μl]	6,84±1,05	6,58±0,55	5,78±0,92	5,55±0,65	5,00±0,90	6,75±0,41
RBC [x10 ⁶ /μl]	4,35±0,09	4,11±0,11	4,49±0,18	5,28±0,56	5,27±0,17	5,09±0,27
HGB [g/dl]	13,32±0,35	12,73±0,32	13,80±0,43	16,00±1,00	14,70±1,90	15,35±0,67
HCT [%]	38,90±0,72	37,52±0,91	40,43±1,74	46,80±3,20	43,50±4,5	44,23±1,57
MCV [fL]	89,55±1,85	91,45±1,63	90,03±0,50	89,00±3,40	82,35±5,85	87,30±2,71
MCH [pg]	30,68±0,92	31,03±0,36	30,78±0,27	30,45±1,35	27,80±2,70	30,28±1,05
MCHC [g/dl]	34,22±0,37	33,95±0,52	34,18±0,40	34,20±0,20	33,7±0,90	34,68±0,37
RDW [%]	13,40±0,51	13,47±0,30	13,58±0,77	13,20±0	15,50±3,30	13,15±0,23
PLT [x10 ³ /μl]	274±27,23	227±37,62	242±26,69	211±1,00	168±55	216±9,61
LYM [%]	25,42±2,79	25,35±4,29	29,00±3,44	23,65±2,75	28,65±1,85	24,35±5,34
Neutrophile [%]	63,60±3,33	63,97±4,67	58,98±3,00	62,55±5,05	52,75±4,85	63,85±6,79
Monozyten [%]	7,42±0,65	7,50±0,35	8,25±0,55	8,55±0,25	12,25±0,85	8,65±0,70
Eosino- phile [%]	2,80±0,65	2,40±0,73	2,58±0,98	4,35±1,95	5,60±1,9	2,45±1,03
Basophile [%]	0,76±0,18	0,63±0,15	1,20±0,30	0,90±0,10	0,75±0,25	0,68±0,17

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; HCT Hämatokrit HGB Hämoglobin LYM Lymphozyten MCH mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt MCHC mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration MCV mittleres korpuskuläres Volumen PLT Blutplättchen RBC Rote Blutzellen RDW red cell distribution width WBC Weiße Blutzellen.

3.2.2 Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen

Die DGZ beruht darauf, dass sich Partikel einer bestimmten Dichte in einer Phase des Dichtegradienten sammeln. Mithilfe einer isotonischen Lösung des Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymers Biocoll (Dichte = 1,077 g/mL) ist es dabei möglich, PBMC in einer Interphase anzureichern (siehe **Abbildung 3.6**).

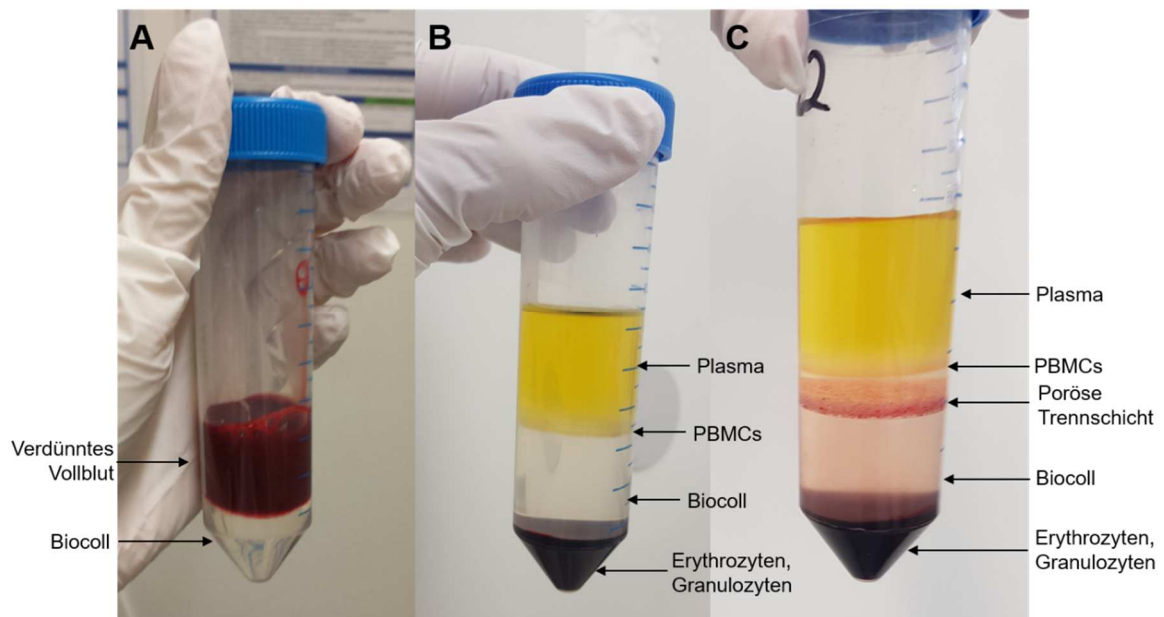


Abbildung 3.6 Isolationsprozess PBMCs. A Gradientenbildung vor DGZ. 16 ml verdünntes Blut werden auf 15 ml Biocoll geschichtet. **B Phasenauftrennung des Vollblutes nach DGZ in einem herkömmlichen Falcon.** Durch die DGZ reichern sich die Blutbestandteile je nach Dichte im Dichtegradienten an. Von oben nach unten: Plasma, PBMCs, Biocoll, Erythrozyten und Granulozyten. **C Phasenauftrennung des Vollblutes nach DGZ in einem Leucosep™-Tube.** Durch die DGZ reichern sich die Blutbestandteile je nach Dichte im Dichtegradienten an. Von oben nach unten: Plasma, PBMCs, poröse Trennschicht, Biocoll, Erythrozyten und Granulozyten. Die poröse Trennschicht trennt die PBMCs vom Biocoll ab und erleichtert so die Abnahme der PBMCs. DGZ=Dichtegradenzentrifugation; PBMCs=Periphere mononukleäre Blutzellen.

Vor der Schichtung des Vollblutes auf das Biocoll (15 ml in 50 ml Falcon) wurde es mit dem gleichen Volumen an Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS, engl. Dulbeccos's Phosphate-Buffered Saline) verdünnt. Bei der Verwendung der *Leucosep™*-Tubes der Firma Greiner-Bio konnte das Blut zügiger aufgegeben werden, da die Trennscheibe eine Vermischung des Blutes mit dem Biocoll verhindert. *Leucosep™* sind konische 50 mL Röhrchen, die eine poröse Trennscheibe aus glasähnlichem Polyethylen besitzen. Die Trennscheibe zeichnet sich durch eine präzise kontrollierte Porengröße aus und verhindert auch nach der Zentrifugation eine Kontamination der angereicherten Zellfraktion bei der Abnahme. Vor ihrem Einsatz wurden die *Leucosep™* mit 15 mL Biocoll befüllt und für 30 s bei 1000 x g / ACC = 9 / DEC = 9 zentrifugiert, sodass sich das Biocoll unter der Trennscheibe sammeln konnte.

Anschließend erfolgte bei beiden Falcons die DGZ bei RT für 10 min bei 1000 x g / Beschleunigung (ACC, engl. acceleration) = 6 / Abbremsung (DEC, engl. deceleration) = 0, bei der das Blut in die beschriebenen Phasen aufgetrennt wurde. Nach der Zentrifugation wurde zunächst das Plasma bis auf einen Überstand von 5 bis 10 mm über der Zellschicht abgenommen und verworfen. Dies ist wichtig, um Kontaminationen mit Thrombozyten zu vermeiden. Eine Kontamination mit dem Trennmedium sollte ebenfalls vermieden werden. Die PBMC-Schicht wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 50 mL Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde mit 25 mL DPBS aufgefüllt und abermals bei RT für 10 min bei 100 x g / ACC = 9 / DEC = 6 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet zunächst in 2 mL DPBS resuspendiert. Danach wurde ebenfalls mit PBS auf 25 mL aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei RT für 10 min bei 100 x g / ACC = 9 / DEC = 6. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet wurde entweder für die ATP-Messung in 1 mL RPMI-Medium oder für die Messung am Oxygraphen in 1 ml MiR05 resuspendiert. Anschließend folgte die Zählung der Zellen mit dem Zellzähler TC20 (BioRad) (siehe unten). Die Proben für die späteren qPCR-Analysen wurden in 300 µl RNAprotect® Cell Reagent resuspendiert und bei -80°C für die spätere Bestimmung gelagert.

Zellzählung mit dem automatischen Zellzähler TC20 (BioRad)

Nach der Isolation der PBMC wurde die Zellzahl mit dem automatischen Zellzähler TC20 (BioRad) bestimmt. Dazu wurden 10 µL der Zellsuspension entnommen und 1:10 mit dem entsprechenden Medium verdünnt. 10 µL dieser Verdünnung wurden dann zu 10 µl Trypanblau pipettiert und 10 µl dieser weiteren Verdünnung wurden in eine Kammer der Einmal-Zählkammer (passend für TC20) pipettiert. Anschließend wurde die Einmalzählkammer in das Gerät eingeführt. Der zu zählende Bereich wurde für PBMC auf 6 bis 10 µm Zelldurchmesser eingestellt. Die Trypanblaufärbung dient der Bestimmung der Zellviabilität. Für die ATP-Messung wurde die Zellsuspension anschließend so verdünnt, dass 50.000 bzw. 100.000 Zellen pro Well (100µL Endvolumen/ Well) ausgesät wurden. Für die Messung der Respiration wurde die Zellsuspension auf 4×10^6 Zellen/ ml MiR05 eingestellt.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie sowie deren Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Nelli Baal von der FACS-Core-Facility des Universitätsklinikum Gießen. Es wurde ein Viabilitätstest der Zellen durchgeführt, indem tote Zellen mit Cytox Pacific Blue angefärbt wurden. Die Zusammensetzung der PBMC-Proben wurde durch Antikörpernachweis ermittelt. Es wurden Antikörper ge-

gen folgende *Cluster of differentiation* (CD) verwendet: CD56 (NK-Zellen), CD14 (Myelomonozytische Zellen), CD16 (Neutrophile, NK-Zellen, Makrophagen), CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) (siehe **Tabelle 3.9**).

Tabelle 3.9 Zellarten und CD-Expressionen der FACS-Analyse.

Zellart	CD-Expression
NK-Zellen	CD56+, CD16+
Monozyten	CD14+, CD16-
T-Lymphozyten und B-Lymphozyten	CD14-, CD16-, CD3+, CD19+
Neutrophile Granulozyten	CD14+, CD16+

NK Natürliche Killerzellen CD Cluster of differentiation.

3.2.4 Messung der ATP-Konzentration

Die ATP-Konzentrationen wurden mittels des *ViaLight Plus Bioluminescence Kit* (Lonza, Walkersville, USA) bestimmt. Hierzu wurden die PBMCs wie in **Kapitel 3.2.2** beschrieben in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und nach einer dreistündigen Akklimatisierungsphase vermessen. Die Messung beruht auf der Umsetzung von ATP und Luciferin zu Licht mittels Luciferase. Die entstehende Biolumineszenz ist proportional zur ATP-Konzentration. Die ATP-Konzentration in den Wells kann über einen ATP-Standard (0,01-5 μM) bestimmt werden. Zur Zelllyse und damit der Freisetzung des ATPs aus den Zellen werden 50 μL *Cell Lysis Reagent* zur Zellsuspension gegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 μL *Monitoring Reagent plus*. Die Biolumineszenz wurde nach 5 min im Victor X3 2030 oder CLARIOstar *Multilable Reader* erfasst.

3.2.5 Respiratorische Messungen (Oxygraph-2k)

Die Untersuchung der mitochondrialen Atmung erfolgte mittels dem Oxygraph-2k System (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich). In den im System enthaltenen, voneinander unabhängigen Kammern sind zwei AgCl_2 -Elektroden angebracht. Die Sauerstoffkonzentration kann über die Veränderung des Widerstandes mittels der Elektroden über die Zeit in den Kammern bestimmt werden. Es werden gezielt Substrate und Inhibitoren der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette hinzugegeben, um somit die Atmung der Komplexe zu messen (siehe **Abbildung 3.7**). Dadurch kann eine Aussage über die Funktionalität der Komplexe und die Intaktheit der Atmungskette in den isolierten PBMCs getroffen werden. Vor der Messung wurden jeweils 2,4 ml MIR05 (37 °C) in die Kammern gegeben und für ca. 30 min äquili-

briert. Für die Messung an Zellen wurde das MIR05 komplett entfernt und durch 2,4 ml Zellsuspension [4×10^6 Zellen/ml MIR05] ersetzt und äquilibriert (endogene Atmung), sodass sich am Ende in jeder Kammer 8×10^6 Zellen befanden. Nach der Stabilisierung der endogenen Atmung der Zellen, werden die Zellen durch die Zugabe von Digitonin permeabilisiert, um die Membran für die Substrate und Inhibitoren durchlässig zu machen. Anschließend erfolgt die Zugabe von Komplex I- Substraten Glutamat [10 mM] und Malat [2 mM] (Leak-Atmung ohne ADP, Leak (P/M)). Die nachfolgende Zugabe von ADP [2 mM] ermöglichte die Erfassung der Komplex I-Aktivität (KI). Die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), d.h. die Gesamtatmung von Komplex I und II, wird durch die Zugabe von Succinat bestimmt, wobei es sich um ein Substrat des Komplexes II handelt. Die Zugabe von FCCP bis zur Sättigung ([0,5 μ M] Schritte) führt zu einer Entkopplung der Atmungskette von der Substratzugabe, zu einem Abbau des MMP und zur Wiederherstellung des Protonengradienten bei voller Atmung der Atmungskette durch Komplex I bis Komplex IV. So kann die maximale Aktivität des Elektronentransfersystems (ETS) erfasst werden. Anschließend wird Rotenon [0,5 μ M], ein Komplex I-Inhibitor, gegeben, um die Atmung des Komplexes I von der des Komplexes II differenzieren zu können. In diesem Stadium kann die entkoppelte Komplex II-Aktivität detektiert werden. Durch Zugabe des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin [2 μ g/ml] wird der Protonengradient durch das Protonenleak verlangsamt abgebaut. Komplex III wird im Anschluss durch Antimycin A [2,5 μ M] gehemmt und ermöglicht somit die Messung der *Residual oxygen consumption* (ROX), des Sauerstoffverbrauchs ohne Beteiligung der mitochondrialen Atmung. Zuletzt wird die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) Aktivität durch die Gabe von Tetramethylphenylenediamin (TMPD) [0,5 mM], einem künstlichen KIV-Substrat, und Ascorbat [2 mM] um TMPD im reduzierten Zustand zu erhalten, gemessen. Durch Zugabe von Natriumazid [> 100 mM] wird die gesamte Atmungskette inhibiert. Die hiernach gemessene Sauerstoffkonzentration muss von der Komplex IV-Atmung abgezogen werden, da es sich hier um Werte handelt, die nicht mehr von der Aktivität der Atmungskette stammen. Weiterhin wurde von allen Atmungsaktivitäten ROX abgezogen. Um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff während der Messung zu gewährleisten, wurden die Kammern zwischendurch kurz geöffnet. Dies erfolgte üblicherweise nach Zugabe von Oligomycin und Ascorbat/ TMPD.

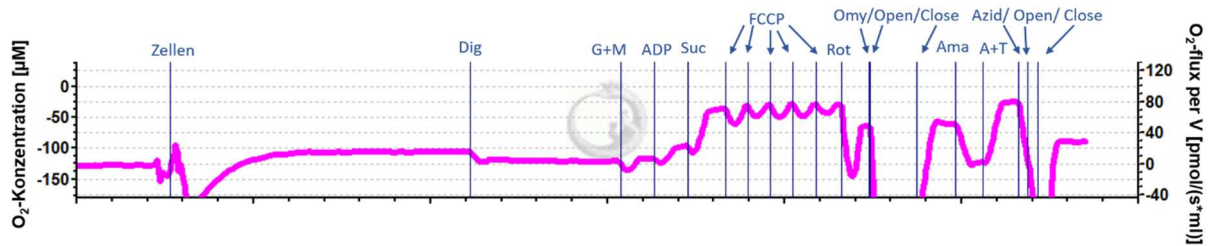


Abbildung 3.7 Beispiel einer respiratorischen Messung (Oxygraph-2k) mit isolierten PBMCs. Die Sauerstoffkonzentration ist in blau, der Sauerstoffverbrauch in pink dargestellt. Dig= Digitonin G+M= Glutamat und Malat; ADP= Adenosindiphosphat; Suc=Succinat; Rot=Rotenon; Omy= Oligomycin; Ama=Antimycin; A+T= Ascorbat+Tetramethylphenylenediamin.

3.2.6 Quantitative real-time PCR

3.2.6.1 Isolation der mRNA aus Zellen

Die Isolation der mRNA aus den PBMCs erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Quiagen, Hilden), die bis zur Verarbeitung stabilisiert in RNAprotect® Cell Reagent bei -80°C gelagert wurden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 10 min bei 14.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss abgenommen, die Zellen in 350 µl RLT-Puffer (+10 % β-Mercaptoethanol) unter Verwendung einer Kanüle homogenisiert und die Zellstruktur wurde aufgebrochen. Nach der Zugabe von 350 µl Ethanol (70%) wurde die Suspension auf eine RNeasy Säule pipettiert und für 30 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es erfolgte ein Waschschriff, bei dem 700 µl RW1-Puffer auf die RNeasy Säule appliziert wurden. Nach einer Zentrifugation für 35 s bei 10.000 rpm wurde der Durchfluss erneut verworfen und es folgten zwei weitere Waschschriffe mit je 500µl RPE-Puffer. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Säule bei 10.000 rpm für 2 min trocken zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde verworfen und die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Zur Eluierung der mRNA wurden 50µl RNase-freies Wasser auf den Filter gegeben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA (1µl unverdünnt) erfolgte mit dem NanoDrop One (Thermo-Scientific) bei 260nm und 280nm. Die Reinheit der RNA wurde über die Quotienten A260/A280 (1,8-2,0) und A260/A230 (> 1,5) kontrolliert.

Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau mit dem Turbo DNA-free™ Kit durchgeführt. Hierfür wurde zu 50 µl RNA (< 200 µg/ml) 5 µl des 10x TURBO DNase-Puffer und 1 µl TURBO DNase hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 25 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 5 µl DNase Inactivation Reagenz hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Damit wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend bei 10.000 g und RT für

90 s zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA-Konzentration sowie oben beschrieben am NanoDrop One erneut ermittelt.

Die mRNA wurde entsprechend der bestimmten Konzentration für die cDNA-Synthese aliquotiert (0,5 µg RNA pro Syntheseansatz) und bei –80°C gelagert.

3.2.6.2 Herstellung von cDNA

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München). Zur Herstellung der cDNA wurden die RNA-Aliquots aufgetaut und mit RNase-freiem H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden daraufhin 10 µl Mastermix (5 µl RNase-freies H₂O, 4 µl 5x iScriptase Reaction Mix und 1 µl iScript Reverse Transcriptase) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation im T100™ Thermocycler (BioRad) (5 min bei 25 °C, 20 min bei 46°C und 1 min bei 95°C, Deckeltemperatur 105°C). Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2.6.3 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Die mRNA-Expression (Genexpression) wurde mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) mit Hilfe von Target spezifischen Primern am CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, München) gemessen. Dazu wurden die cDNA-Aliquots nach dem Auftauen 1:10 mit RNase -freiem H₂O verdünnt. In eine 96-Well PCR-Platte (Hard-Shell) wurden pro Well 8 µl des Mastermixes (5 µl SYBR Green Supermix, 1 µl verdünntem Primer Stock (2 bzw. 4µM), 2 µl RNase -freiem H₂O) pipettiert. Die verdünnte cDNA wurde im Anschluss in einem Volumen von 2 µl pro Well in Triplets hinzugegeben. Als Kontrolle diente RNase-freies H₂O. Die PCR-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und im Thermocycler inkubiert. Die Zyklusbedingungen für die qRT-PCR sind in **Tabelle 3.10** zusammengefasst.

Tabelle 3.10 Zyklusbedingungen für die qRT-PCR.

Zyklus-Phase	Temperatur [°C]	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95	3 min
2. Denaturierung	95	10 s
3. Annealing	56-58	30 s/ 45 s
4. Elongation	72	29 s
Anzahl der Zyklen	45	

Je nach verwendetem Primer kann die Primerkonzentration, Annealing-Zeit und Temperatur variieren. Im Anschluss an die relative Quantifizierung erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse,

um Primerdimere oder unspezifisches Annealing der Primer zu detektieren. Die Schmelzkurve wird bei einem Temperaturanstieg von 65 °C auf 95 °C mit einer Heizrate von 0.5 °C/5 s über einen Zeitraum von 5 min aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte mittels der 2- $\Delta\Delta C_q$ Methode mit Hilfe des BioRad CFX Manager (BioRad, München).

3.2.7 Messung der Citratsynthase (CS)-Aktivität

Das CS-Assay beruht auf der irreversiblen Umwandlung von DTNB mit CoA-SH zu TNB und CoA-S-S-TNB, katalysiert durch die CS. Das entstehende TNB kann bei 412 nm spektrometrisch detektiert werden. Die Absorption wird über 200s im Spektrometer erfasst und steigt mit der Zeit linear an. Eine Auftragung der Absorption gegen die Messzeit ermöglicht die Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität. Über diese kann wiederum auf die Anzahl an intakten Mitochondrien geschlossen werden, womit die CS-Aktivität ein Marker für die mitochondriale Masse ist (Larsen *et al.* 2012).

Die CS wurde in den isolierten PBMCs nach dem Protokoll von Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich, bestimmt. Die verwendete Zellsuspension war jeweils ein Aliquot der Lösung für die respiratorischen Messungen und wurde bis zur CS-Messung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden 200 μ l der Zellsuspension zu dem Reaktionsmedium für die Messung der CS (siehe 3.1.5) gegeben. Dem Reaktionsmedium wurde H₂O zugeführt, sodass ein Endvolumen von 1 ml erreicht wurde. Die Zellsuspension und das Reaktionsmedium wurden für 5 min auf 30°C im Wasserbad erwärmt und nach dem Zusammenführen von Probe und Reaktionsmedium in einer Quarz-Küvette sofort im Spektrometer bei 412 nm über 200 s (einfache Kinetik, 10 s Intervall) vermessen. Es wurden Mittelwerte aus 2-3 Messungen berechnet. Die spezifische Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{r_A}{l \cdot \epsilon_B \cdot v_B} \cdot \frac{V_{Küvette}}{V_{sample} \cdot \rho}$$

v= Spezifische Citratsynthase-Aktivität [μ mol/min/ 10^6 Zellen]; r_A =Änderung der Absorptionsrate pro min; ϵ_B =Extinktionskoeffizient von TNB bei 412 nm und pH 8,1 [= 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹]; v_B =Stöchiometrische Äquivalent von TNB in der Reaktion (=1); $V_{Küvette}$ =Volumen des Reaktionsansatzes in der Küvette (=1000 μ L); V_{sample} =Volumen der Probe in der Küvette; ρ =Massenkonzentration bzw. Dichte der Zellen in der Probe (Proteinkonzentration in mg/cm³, Zelldichte $10^6 \times$ cm³).

3.2.8 Bestimmung der Chronotypen

Das Schlafverhalten wurde anhand eines speziellen Fragebogens, dem Munich ChronoType Questionnaire (MCTQ) von Roenneberg *et al.* (2013), erfasst (Roenneberg *et al.* 2003). Mithilfe dieses Fragebogens können anhand der Schlafdauer und der Bettgeh- und Aufstehzeit spezifische Chronotypen ermittelt werden. Auf diesem Weg können Tendenzen erfasst werden, die zum Teil bestimmte genetische Charakteristika indizieren. Die Chronotypen werden differenziert in "Lärchen" (niedriger Chronotype) und "Eulen" (hoher Chronotype), die wiederum eine Tendenz zum Frühaufstehen "morningness" oder spät ins Bett gehen "eveningness" bedingen. Neben dem Schlafverhalten werden über den Fragebogen noch Angaben zum Arbeits- und Freizeitverhalten, dem Aufenthalt im Freien sowie der durchschnittlichen Einnahme von Stimulanzien erfasst.

3.2.9 Messung der Melatoninspiegel

Für die Bestimmung der Melatoninspiegel wurde eine Blutprobe jedes Studienteilnehmers bei 2500 g für 10 min zentrifugiert und das erhaltene Serum wurde unmittelbar bei -20°C weggefroren. Nach Abschluss der Studie wurden die Melatoninspiegel von der Firma MVZ Dr. Eberhard and Partner (Dortmund, Germany) mittels Radioimmunoassay bestimmt.

3.2.10 Magnet Resonanz Spektroskopie (MRS) Protokoll

Die MRS-Messungen und Auswertung der Daten wurden von Dr. Ulrich Pilatus (Goethe Universität Frankfurt, Institut für Radiologie) nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Die MR-Untersuchungen erfolgen am Brain Imaging Center (BIC) des Universitätsklinikums Frankfurt. Es steht ein 3T Ganzkörpersystem (Magnetom Trio, Siemens, Erlangen, Germany) zur Verfügung, das für Untersuchungen des Schädels optimiert ist.

Dabei erfolgt die spektroskopische Bildgebung mit einer doppelt abgestimmten $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ Volumen Kopfspule (Rapid Biomedical, Würzburg, Germany), sodass die ^1H (Protonen)- und die ^{31}P (Phosphor)-Daten in einem Untersuchungsdurchgang gemessen werden können. Nach einer anatomischen Bildgebung (T1-gewichtet, etwa 6 min.), die zur Navigation und Bestimmung von grauer und weißer Substanz in den Targetregionen verwendet wird, schließt sich die spektroskopische Bildgebung (MRSI) an. Hierzu werden (1) eine zweidimensionale ^1H MRSI mit einer Schichtdicke von 1 cm, einem Gesichtsfeld von 240 mm² und einer Größe eines einzelnen Messvolumens (Voxel) von 7,5 x 7,5 x 10,0 mm³ (Repetitionszeit (TR) 1500 ms und die Echozeit (TE) 30 ms, Messzeit 12 min); (2) eine dreidimensionale ^{31}P (Phosphor)-

MRSI mit einem Gesichtsfeld von 300x300x200 cm³ und einer Voxel Größe von 17,5 x 17,5 x 25,0 mm³ (TR von 2000 ms, Messzeit 18 min) durchgeführt.

Die spektroskopischen Daten werden mit den bereits in der Neuroradiologie vorhandenen etablierten Software Tools LC Model und jMRUI unter Berücksichtigung von Paritalvolumen-effekten ausgewertet, analog zu der von Blasel *et al.* (2012) beschriebenen Vorgehensweise.

3.2.11 Bestimmung verschiedener Blutparameter

Das Differentialblutbild und alle weiteren Bestimmungen im Blut wurden von der Laborarztpraxis Frankfurt durchgeführt.

3.2.12 Bestimmung des Omega-3-Indexes

Die Bestimmung des Omega-3-Indexes im Vollblut wurde von der Firma Omegamatrix mit Hilfe der GC-FID durchgeführt. Die Blutproben wurden nach der Abnahme bei -80°C weggefroren und nach Abschluss der Studie auf Trockeneis versandt.

3.2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 8.0.1. Die erhobenen Messwerte sind als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (\pm SEM) dargestellt. Für die statistische Überprüfung von Unterschieden zwischen zwei Messgruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige *t*-Test, für Unterschiede zwischen mehr als zwei Messgruppen eine 1-way ANOVA mit dem Tukey's Multiple Comparison Test oder Sidak's multiple comparisons test verwendet. Bei nicht ungleichen Standardabweichungen von zwei Gruppen wurde ein Welch's *t*-test durchgeführt. Beim Vergleich von Messwerten von einem Individuum, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben wurden, wurde ein gepaarter *t*-Test durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierungsversuche

Das primäre Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der mitochondrialen Funktion in humanen peripheren mononukleären Blutzellen. Da dafür noch keine standardisierte Methodik existiert, musste die Methode zunächst etabliert werden. Dazu wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um auch in der Literatur noch offene Fragestellungen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde neben noch anderen, hier nicht publizierten Versuchen in der ersten Studie untersucht, ob die Isolation der PBMCs mit unterschiedlichen Zentrifugenröhrchen einen Einfluss auf die Reinheit und Effektivität der Isolation sowie auf die anschließende Messung der ATP-Spiegel und der mitochondrialen Respiration hat. In einer weiteren Etablierungsstudie wurde der Einfluss des Schlafhormons Melatonin auf die Messungen der mitochondrialen Funktion in PBMCs erforscht (Silaidos *et al.* 2020).

4.1.1 Vergleich zweier Zentrifugenröhrchen zur Isolation von PBMCs

4.1.1.1 Einfluss auf die Effektivität und Reinheit der Isolation

Der Einfluss der unterschiedlichen Zentrifugenröhrchen auf die Effektivität der Isolation wurde durch die Ermittlung der Zellzahl untersucht. Die speziellen Zentrifugenröhrchen *Leucosep*TM führten im Vergleich zu den klassischen *Falcons* zu keiner höheren Ausbeute an Zellen. Bei den *Falcons* betrug die durchschnittliche Anzahl an Zellen $6,6 \times 10^6$ Zellen/ml, bei den *Leucosep*TM $7,4 \times 10^6$ Zellen/ml (siehe **Abbildung 4.1**). Die Standardabweichungen waren bei beiden Varianten mit $2,19 \times 10^6$ (*Falcon*) und $2,06 \times 10^6$ in einem ähnlichen Bereich.

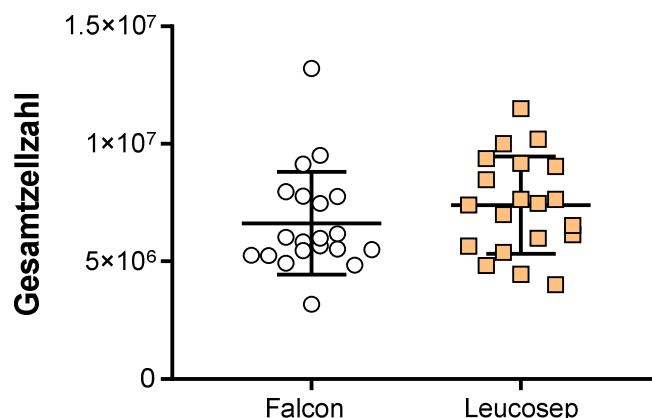


Abbildung 4.1 Zellanzahl nach der Isolation mit unterschiedlichen Zentrifugenröhrchen. Die Gesamtzellzahl unterscheidet sich zwischen der Isolation mit *Falcons* und *Leucosep*TM nicht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; n= 2; N=20; ungepaarter t-test; p=0,26. N=Anzahl der Messwiederholungen.

Auch auf die Reinheit der Isolation, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde, hatten die *Leucosep*TM-Tubes keinen Einfluss. Beide Reaktionsgefäße führen zu einer reinen Isolation ohne Verunreinigungen mit Thrombozyten oder Granulozyten (siehe **Abbildung 4.2** und **Abbildung 4.3**).

Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellzusammensetzung der PBMCs zwischen *Falcon* und *Leucosep*TM (siehe **Abbildung 4.2** und **Abbildung 4.3**). NK-Zellen (CD16+, CD56+) machten im Durchschnitt 3,91 % bei *Falcon* und 3,22 % bei *Leucosep*TM an der Gesamtpopulation aus. Die Monozyten (CD16-, CD14+) waren mit 15,03 % (*Falcon*) und 11,03 % (*Leucosep*TM) die zweitgrößte Population. Neutrophile Granulozyten (CD14+, CD16+) wurden weder bei der normalen Isolation (0,37 %) noch bei der mit den *Leucosep*TM-Röhrchen (0,34 %) in nennenswertem Umfang mitisoliert. Die größte Zellpopulation stellten die B- und T-Lymphozyten (CD3+, CD19+, CD14-, CD16-) dar. Ihr Anteil betrug bei *Falcon* 70,10 % und bei *Leucosep*TM 69,82 %. Interessanterweise wurden sowohl bei *Falcon* als auch bei *Leucosep*TM unbekannte Partikel detektiert. Deren Anteil lag bei *Falcon* bei 10,54 % und bei *Leucosep*TM bei 15,52 %. Trotz mehrfacher Analyse und Überprüfung des benutzten DPBS und Biocolls konnte nicht geklärt werden, um welche Art von Kontamination es sich dabei handelt. Es konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass die unbekannten Partikel Zellen sind.

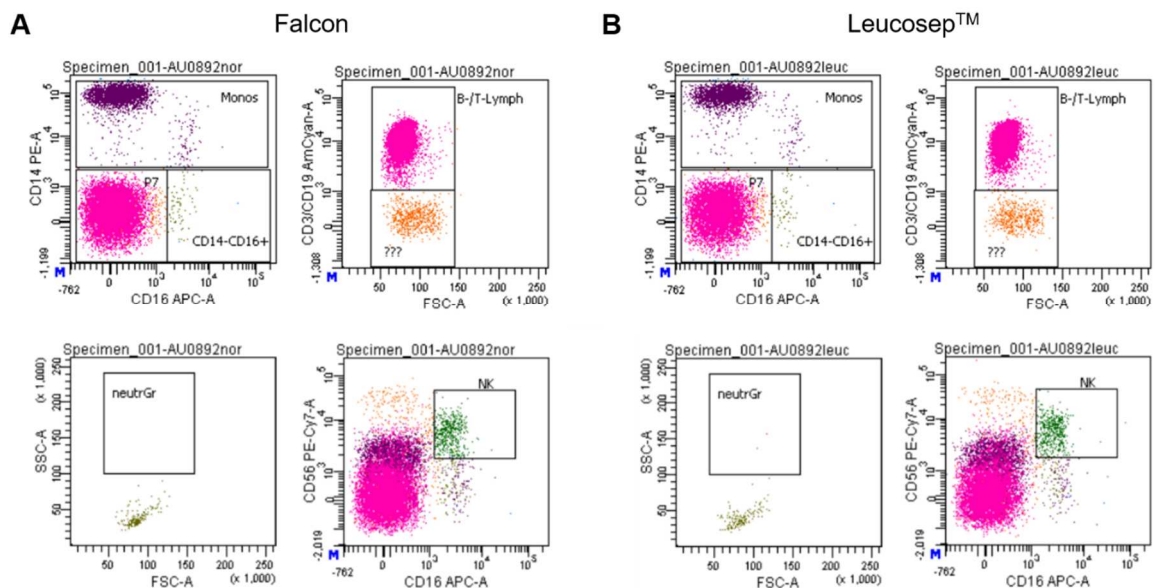


Abbildung 4.2 Zusammensetzung der PBMCs nach der Isolation mit A Falcon und B LeucosepTM Zentrifugenröhrchen. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Probe eines Probanden. Im Uhrzeigersinn: Monozyten (CD14+, CD16-), B- und T-Lymphozyten (CD3+, CD19+, CD14-, CD16-), neutrophile Granulozyten (CD14+, CD16+), NK-Zellen (CD16+, CD56+). PBMC=periphere mononucleäre Blutzellen; N=Anzahl der Messwiederholungen. Die Durchflusszytometrie und deren Analyse erfolgte durch Dr. Nelli Baal.

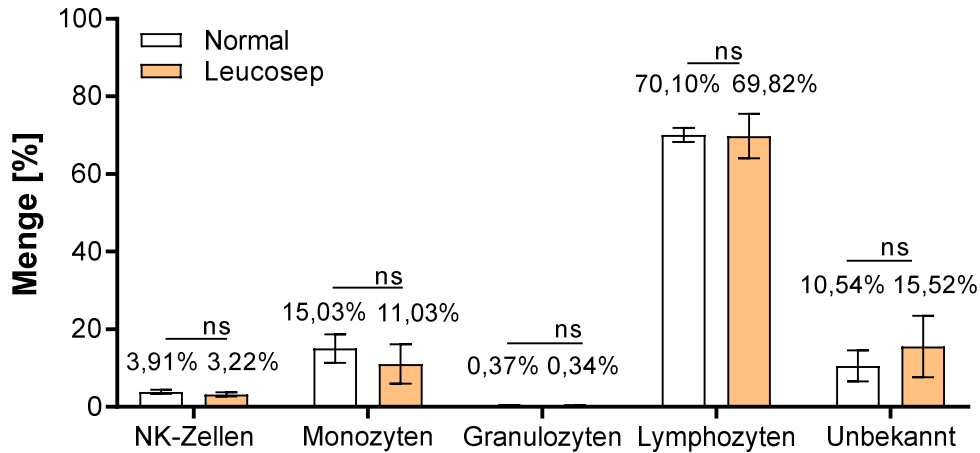


Abbildung 4.3 Prozentuale Anteile der einzelnen Zellpopulation der isolierten PBMCs. Beide Zentrifugengefäße führen zu einer reinen Isolation ohne Verunreinigungen mit Thrombozyten oder Granulozyten. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (ns) in der Zellzusammensetzung der PBMC zwischen Falcon und *Leucosep*TM. Dargestellt sind Mittelwert±SEM; n=2; N=4. NK=Natürliche Killerzellen; N=Anzahl der Messwiederholungen Die Durchflusszytometrie mit den Isolaten und deren Analyse erfolgte durch Dr. Nelli Baal.

4.1.1.2 Einfluss auf die Messung der mitochondrialen Funktion

Neben dem Einfluss auf die Effektivität und Reinheit der Isolation sollte außerdem noch untersucht werden, ob sich die Verwendung der beiden Zentrifugenröhrchen während der Isolation auf die späteren Messungen der ATP-Spiegel oder der mitochondrialen Respiration ausübt.

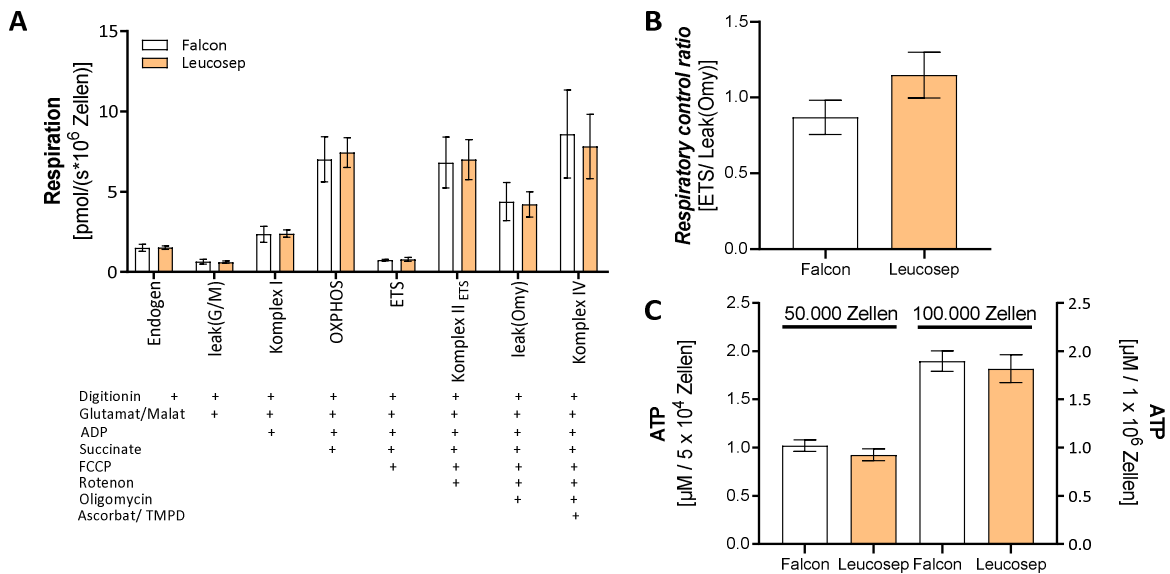


Abbildung 4.4 Einfluss der verschiedenen Zentrifugationsröhrchen auf die mitochondriale Funktion. A Komplexaktivität von PBMCs nach der Isolation mit Falcon oder LeucosepTM. Die Werte wurden auf die Zellzahl normiert. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem +

gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n=2; N=5; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt; p-Werte sind in Tabelle 4.1 dargestellt. **B Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n=2; N=5; ungepaarter t-test; p=0,18. **C Zellzahl normalisierte ATP-Spiegel von PBMCs nach der Isolation mit Falcon oder LeucosepTM**. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n= 2; N=5; ungepaarter t-test; 50.000 Zellen: p=0,28; 100.000 Zellen: p=0,67. ATP=Adenosinriphosphate; ETS=Elektronentransportsystem; N=Anzahl der Messwiederholungen; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen.

Auch bei der mitochondrialen Atmung zeigten sich keine Unterschiede zwischen den *Falcon* und *LeucosepTM*-Tubes (siehe **Abbildung 4.4**). Für alle Untersuchungsparameter der respiratorischen Analyse wiesen die mit *Falcons* isolierten PBMCs ähnliche Werte auf, wie die mit *LeucosepTM* isolierten (siehe **Tabelle 4.1**). Die *respiratory control ratio* (RCR) berechnet sich aus der von der ATP-Synthase entkoppelten, maximalen Atmung (ETS) und dem Leak-Zustand nach der Oligomycin-Zugabe. Je höher die RCR ist, desto besser wird der Protonengradient zur ATP-Synthese genutzt. Eine geringe RCR weist auf ein hohes Leak von Protonen über die mitochondriale Membran ohne Beitrag zur Energieproduktion hin. Die RCR liegt bei den mit *LeucosepTM* isolierten Proben mit einem Wert von 1,15 tendenziell etwas höher als die mit *Falcons* isolierten (0,87), allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant (p=0,18) (siehe **Abbildung 4.4 B**).

Tabelle 4.1 Vergleich Falcon vs. LeucosepTM - Mitochondriale Komplexaktivität in isolierten PBMCs.

	Falcon n=2 ; N=5	LeucosepTM n=2; N=5	p-value
O2k-Oxygraph [pmol/(s*IU CS)]			
Endogene Atmung	1,51 \pm 0,22	1,52 \pm 0,11	0,96
KI	2,35 \pm 0,50	2,40 \pm 0,20	0,94
OXPPOS	7,02 \pm 1,41	7,44 \pm 0,92	0,81
ETS	6,82 \pm 1,59	7,00 \pm 1,25	0,93
KII_{ETS}	4,39 \pm 1,18	4,21 \pm 0,79	0,90
KIV	8,18 \pm 2,66	7,30 \pm 1,92	0,80

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, ungepaarter t-test. ATP Adenosinriphosphate CS Citrat-Synthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem N Anzahl der Messwiederholungen OXPPOS Oxidative Phosphorylierung

Die PBMCs, die mit den herkömmlichen *Falcons* isoliert wurden, wiesen bei 5x 10⁴ Zellen/ml 10% (1,02 \pm 1,9 μ M; 0,92 \pm 0,19 μ M; p=0,28) und bei 1x10⁶ Zellen/ml 5 % (1,90 \pm 0,3 μ M; 1,82 \pm 0,46 μ M; p=0,67) höhere ATP-Spiegel auf, als die mit *LeucosepTM* isolierten (siehe **Abbildung 4.4 C**).

4.1.2 Einfluss von Melatonin auf die Messung der mitochondrialen Funktion

Melatonin wird in circadianen Rhythmen ausgeschüttet, d.h., es liegt zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Aufgrund des wahrscheinlich antioxidativen Potentials des Hormons könnte dies die auf die Isolation folgende Messung der ATP-Spiegel und der mitochondrialen Respiration beeinflussen.

4.1.2.1 Chronotype und Melatoninkonzentration

Da die Melatonin-Freisetzung stark vom Schlafverhalten abhängt, wurde ein spezieller Fragebogen, der Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) nach Roenneberg *et al.* (2003), zur Erfassung des Schlafrhythmus verwendet (Roenneberg *et al.* 2003).

Die Auswertung dieser Fragebögen zeigte Unterschiede in der relativen Häufigkeit der Chronotypen von Frauen und Männern. Die Chronotypen der Frauen variierten von 3 bis 5, allerdings wiesen die meisten Frauen einen Chronotypen von 4 auf. Dies bedeutet, dass die weiblichen Probanden in dieser Studie eher zum Frühaufstehen neigten. Die männlichen Probanden zeigten Chronotypen von 3 bis 7, was wiederum eine spätere Aufwachzeit indiziert (siehe **Abbildung 4.5**).

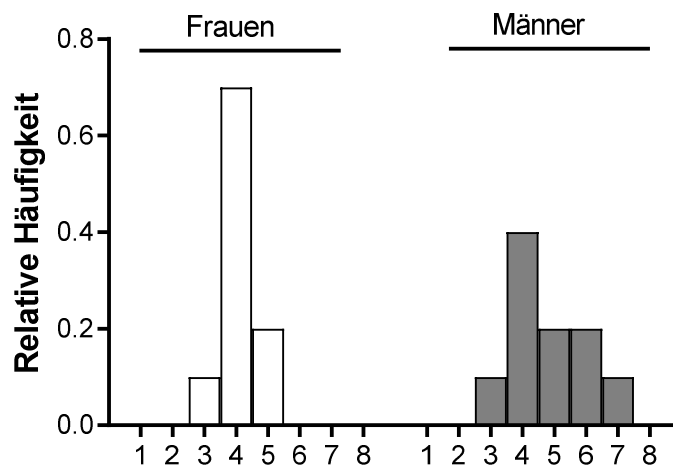


Abbildung 4.5 Chronotypen von weiblichen und männlichen Probanden. Der spezifische Chronotyp kann anhand des Schlafverhaltens unter Verwendung eines speziellen Fragebogens (MCTQ= Munich ChronoType Questionnaire) erfasst werden. Auf diesem Weg können Tendenzen identifiziert werden, die zum Teil bestimmte genetische Charakteristika indizieren. Die Chronotypen werden differenziert in "Lärchen" (niedriger Chronotype) und "Eulen" (hoher Chronotype), die wiederum eine Tendenz zum Frühaufstehen "morningness" oder spät ins Bett gehen "eveningness" bedingen; n=20.

Die Tendenz der Frauen zu *morningness* ist konsistent mit den Erkenntnissen der Melatoninbestimmung im Serum. Um 8 Uhr zeigten die Frauen niedrigere Melatoninspiegel als die Männer. Außerdem konnte bei den Frauen kein Unterschied in der Melatoninkonzentration zwischen 8 Uhr und 14 Uhr festgestellt werden, wohingegen sich die Melatoninkonzentration der Männer zwischen den beiden Zeitpunkten signifikant unterschieden ($p=0,04$) (siehe **Abbildung 4.6**).

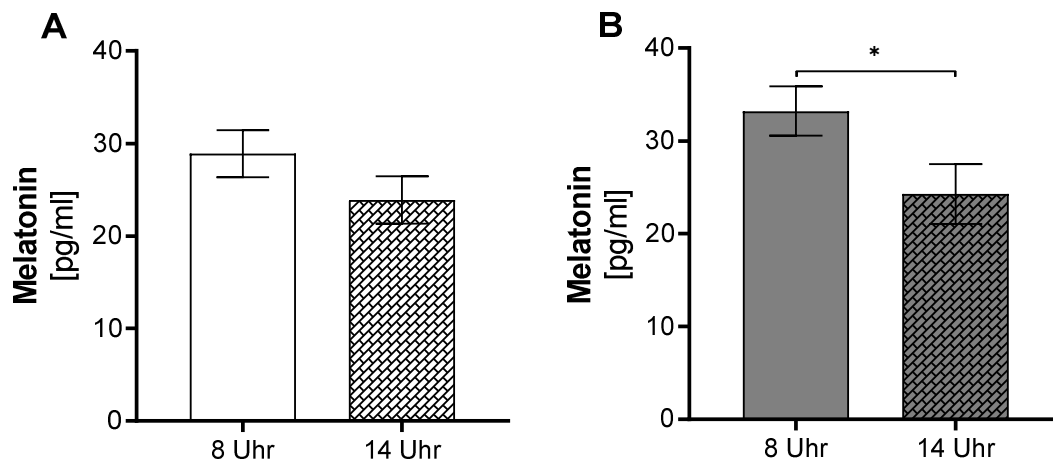


Abbildung 4.6 Melatonin-Konzentration der A weiblichen und B männlichen Probanden um 8 und 14 Uhr. Bei den Frauen konnte kein Unterschied in der Melatoninkonzentration zwischen 8 Uhr und 14 Uhr festgestellt werden, wohingegen sich die Melatoninkonzentration der Männer zwischen den beiden Zeitpunkten signifikant unterscheidet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=20$; $N=40$; gepaarter t-test; A: $p=0,20$; B: $p=0,04$; (* $p<0,05$); N =Anzahl der Messwiederholungen.

4.1.2.2 Einfluss von Melatonin auf mitochondriale Parameter

Melatonin hat einen positiven Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette und hier vor allem auf Komplex I und IV und durch die ATP-Synthase auch auf die ATP-Produktion (Martín *et al.* 2000; Martín *et al.* 2002; Lowes *et al.* 2013; Agil *et al.* 2015).

Bei einer auf Mitochondrien und oxidativen Stress fokussierten Forschung mit PBMCs könnte aus diesem Grund eine Blutabnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Ergebnisse beeinflussen. Die Messung der mitochondrialen Atmung, der ATP-Spiegel und Citratsynthase-Aktivität in isolierten PBMCs wurde deshalb dafür genutzt, den Einfluss von Melatonin auf die mitochondriale Funktion zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen

Als Marker für die mitochondriale Masse wurde die Citratsynthase-Aktivität (CS) bestimmt. Die CS ist ein Enzym des Citratzyklus und ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (Larsen *et al.* 2012).

Die Citratsynthase-Aktivität unterschied sich weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Teilnehmern zwischen den zwei Blutabnahmezeitpunkten (siehe **Abbildung 4.7 A und B**).

Bei den weiblichen Probanden zeigten sich keine Unterschiede der mitochondrialen Respiration (siehe **Abbildung 4.7 C**). Bei den männlichen Probanden kam es bei den PBMCs aus dem Blut von der Abnahme um 14 Uhr zu einer signifikanten Abnahme der Komplex IV-Aktivität (siehe **Abbildung 4.7 D** und **Tabelle 4.2**). Die maximale Atmungskapazität (ETS) war am Nachmittag tendenziell niedriger ($p=0,07$) als am Vormittag. Die mitochondriale Atmung wurde auf die CS-Aktivität normiert und die Ergebnisse beziehen sich somit auf die maximale Atmung pro Mitochondrium. Bei der RCR konnten weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Probanden Unterschiede detektiert werden, d.h. beide Geschlechter nutzen den Protonengradienten zu beiden Zeitpunkten gleich effektiv zur ATP-Synthese.

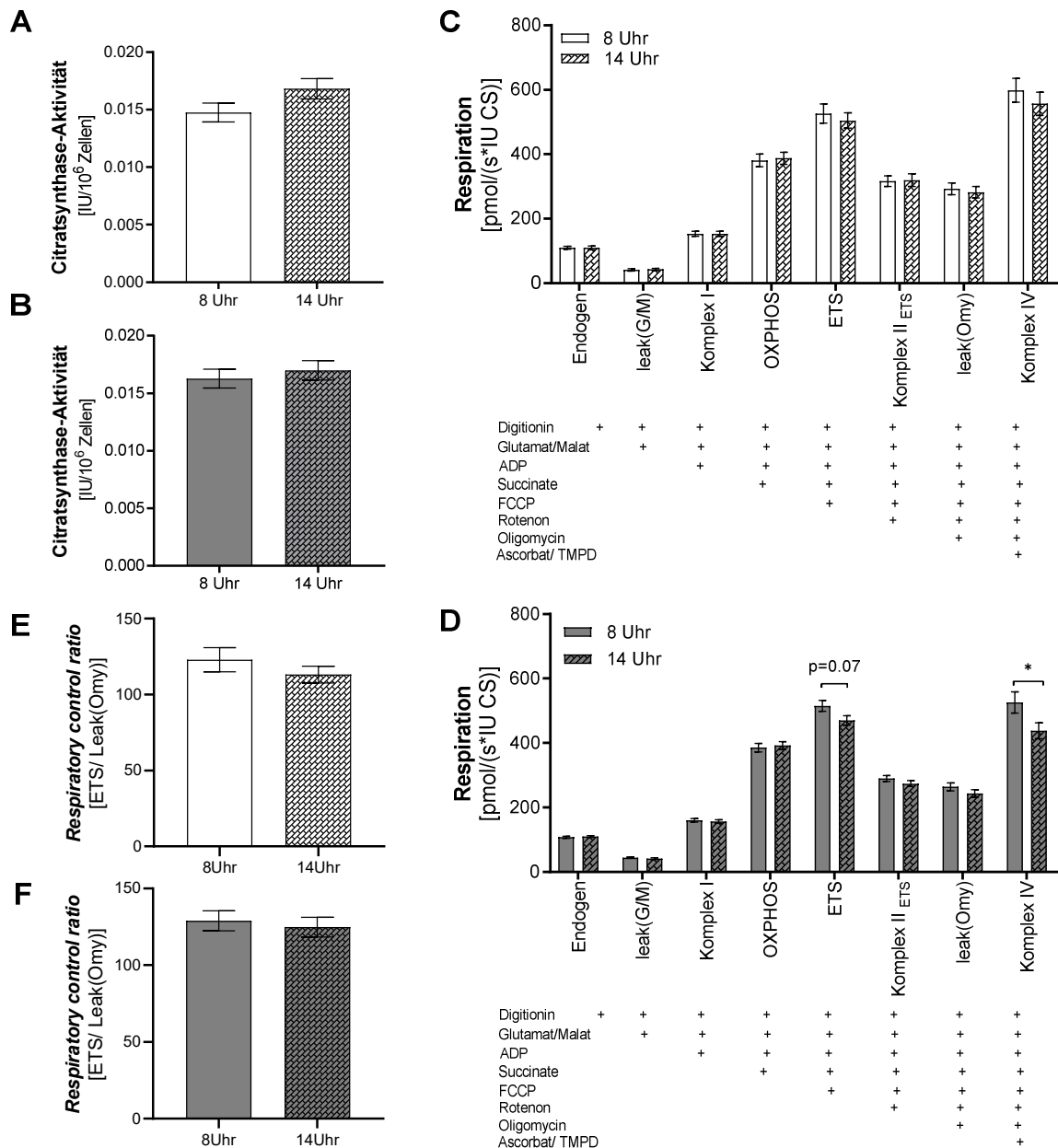


Abbildung 4.7 Einfluss des Melatonins auf die mitochondriale Respiration. Aktivität des mitochondrialen Massemarkers Citratsynthase (CS) in isolierten PBMCs von A Frauen und B Männer. Die Aktivität der CS unterscheidet sich zwischen den zwei Zeitpunkten bei beiden Geschlechtern nicht. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=20; N=40; gepaarter t-test; A: $p=0,12$ B: $p=0,23$. **Mitochondriale Atmung der isolierten PBMCs von C weiblichen und D männlichen Probanden gemessen mit high-resolution Respirometrie.** Die Werte sind normiert auf international Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=20; N=60; für jeden Messzeitpunkt wurde ein gepaarter t-test durchgeführt; p -Werte sind in Tabelle 4.2 dargestellt (* $p<0.05$; ** $p<0.01$). **Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe bei E weiblichen und F männlichen Probanden. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=20; N=40; gepaarter t-test; E: $p=0,32$ F: $p=0,42$. ATP=Adenosintriphosphate; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; G=Glutamat; M=Malat; N=Anzahl der Messwiederholungen; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio.

Die Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe (KI-KIV) bildet einen Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran. Das daraus resultierende Membranpotential repräsentiert die treibende Kraft für die Aktivität des Komplexes V (F_1/F_0 -ATPase) und damit die Produktion von ATP.

Passend zur Abnahme der Komplex IV-Aktivität kam es auch bei den ATP-Spiegeln der Männer zu einem signifikanten Abfall um 14 Uhr (siehe **Abbildung 4.8**). Bei den weiblichen Probanden unterschieden sich die ATP-Spiegel zwischen den beiden Zeitpunkten nicht. Dies ist ebenfalls konsistent zu den Ergebnissen der Messung der Melatoninkonzentrationen und der mitochondrialen Respiration.

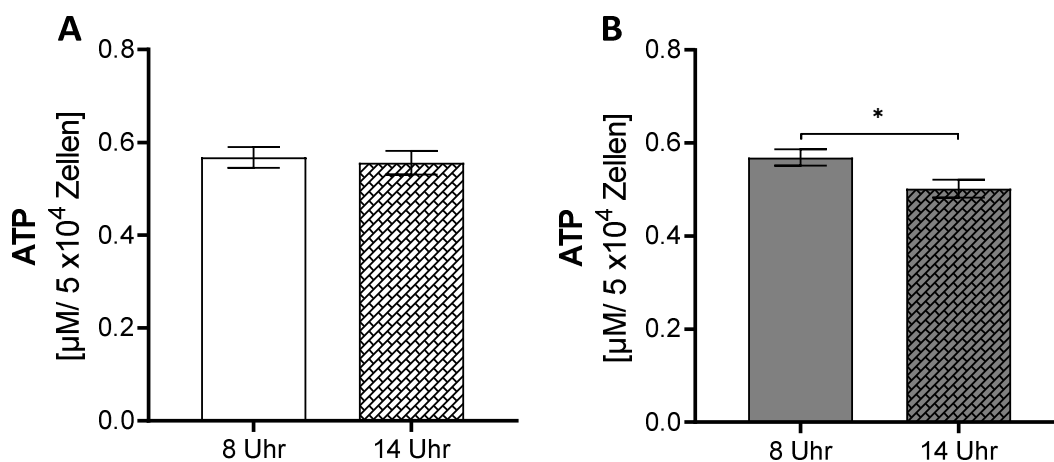


Abbildung 4.8 Zellzahl normalisierte ATP-Spiegel in isolierten PBMCs von A weiblichen und B männlichen Probanden. Die männlichen Probanden zeigten signifikant höhere ATP-Spiegel am Vormittag. In den Proben der weiblichen Probanden konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=20$; $N=60$; gepaarter t-test; A: $p=0.61$; B: $p=0,02$ ($*p<0.05$); ATP=Adenosintriphosphat; N=Anzahl der Messwiederholungen; PBMC=periphere mononukleäre Blutzellen.

Tabelle 4.2 Melatonin-Studie - Mitochondriale Komplexaktivität in isolierten PBMCs.

Zeit	Frauen n=10		p-value	Männer n=10		p-value
	8Uhr	14Uhr		8Uhr	14Uhr	
O2k-Oxygraph [pmol/(s*IU CS)]						
Endogene Atmung	110,0±4,62	109,4±5,77	0,96	107,4±3,26	110,00±2,69	0,60
KI	161,2±10,86	160,0±10,14	0,94	160,0±5,93	156,4±5,46	0,45
OXPPOS	399,6±26,96	402,6±23,24	0,93	289,7±13,25	272,5±12,12	0,77
ETS	526,3±30,06	527,0±32,07	0,98	514,9±16,57	470,2±14,42	0,07
KII _{ETS}	316,5±16,75	319,6±20,19	0,92	289,7±9,46	273,9±8,78	0,29
KIV	580,4±36,14	541,5±36,25	0,40	511,2±32,22	423,4±24,50	0,03*

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, gepaarter t-test, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; (*p<0.05; **p<0.01). ATP Adenosintri-phosphat CS Citrat-Synthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPPOS Oxidative Phosphorylierung.

4.2 Untersuchung der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn

Nach Abschluss der Etablierungsversuche sollte die Methode genutzt werden, um die mitochondriale Funktion in Menschen zu untersuchen. Dies sollte auf der einen Seite der Erfassung von geschlechts- oder altersassoziierten Unterschieden dienen (PECEME und PECEMA), auf der anderen Seite aber auch, um zu untersuchen, ob die mitochondriale Funktion in PBMCs mit mitochondrialen Markern des Gehirns korreliert (siehe **4.2.1** und **4.2.2**). Weiterhin wurde die Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs genutzt, um die Effektivität einer multimodalen Intervention auf die humane mitochondriale Aktivität von Personen mit milden kognitiven Beeinträchtigungen zu erforschen (siehe **4.2.3**).

4.2.1 Studie 1: Etablierung von Biomarkern zur Erfassung des peripheren und zerebralen Energiemetabolismus (PECEME)

Um zu untersuchen, ob die mitochondriale Funktion in der Peripherie mit der mitochondrialen Funktion im Gehirn korreliert, wurden bei gesunden jungen Männern (n=9) und Frauen (n=15) Marker der mitochondrialen Funktion in PBMCs und im Gehirn erfasst. Zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion in PBMCs wurden die ATP-Spiegel gemessen und die mitochondriale Atmungsaktivität mittels hochauflösender Respirometrie mit dem Oxygraph detektiert. Als mitochondrialer Marker im Gehirn wurde die Aminosäure N-Acetyl-Aspartat (NAA) mittels ¹H-Magnetresonanzspektroskopie gemessen. Im Anschluss wurden die Parameter genutzt, um potenzielle geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn aufzudecken. Zur Ergänzung der Daten aus der ATP-Messung und der Messung der Komplexaktivität der mitochondrialen Atmungskette wurden mittels real-Time qPCR die Genexpression von Genen der Mitogenese und der antioxidativen Abwehr analysiert.

Wie in der **Abbildung 4.9** zu sehen ist, konnte zwischen dem individuellen Gehalt an NAA in grauer und weißer Hirnmasse (GM und WM) keine signifikante Korrelation mit dem ATP-Gehalt oder der CS-Aktivität in PBMCs festgestellt werden (siehe **Tabelle 4.3**).

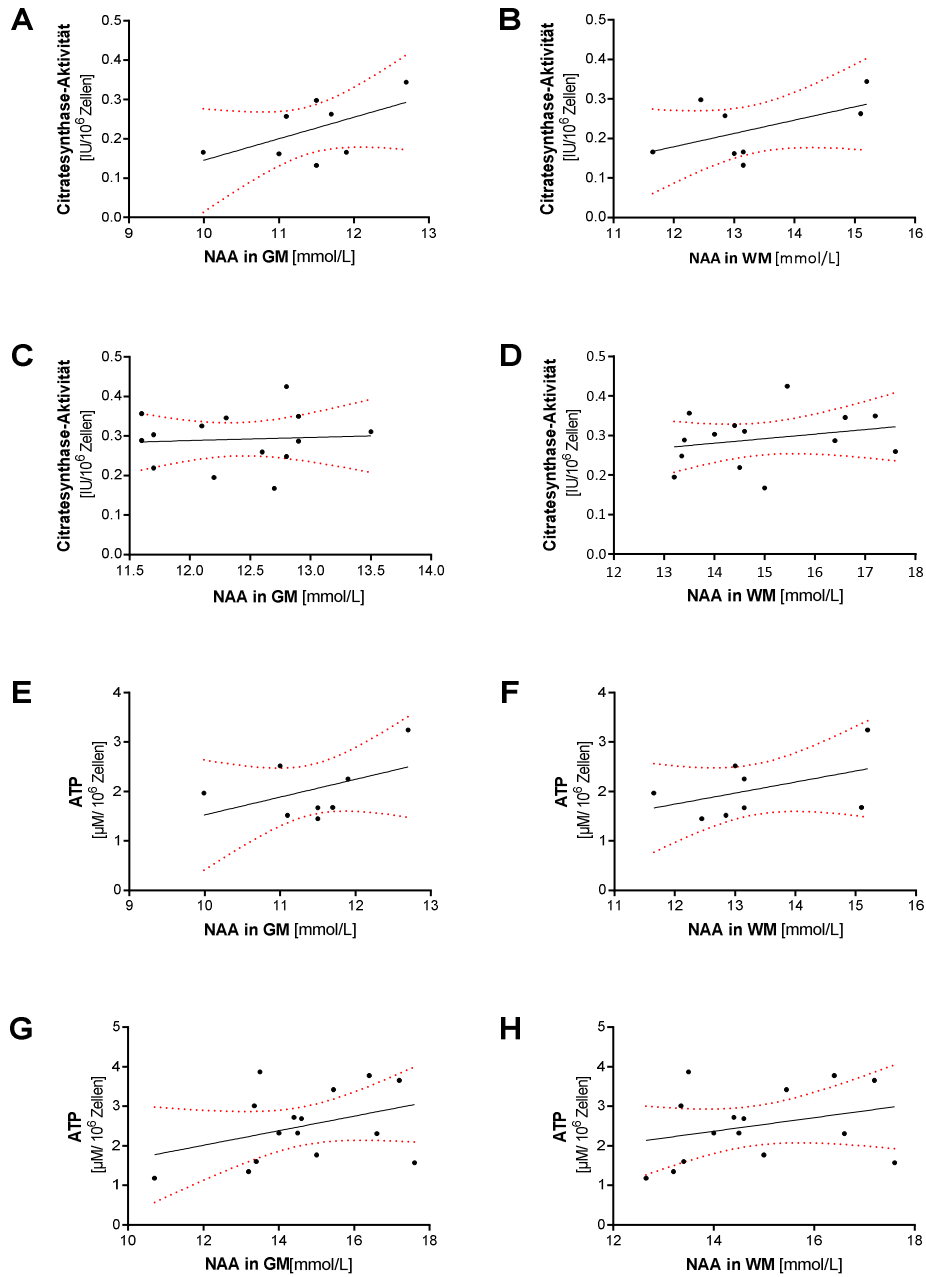


Abbildung 4.9 Korrelationen. Korrelation zwischen der Citratsynthase (CS)-Aktivität in PBMCs und der N-Acetyl-Aspartat (NAA)-Konzentration von männlichen Probanden in **A** der grauen Substanz (GM) und **B** der weißen Substanz (WM) und der weiblichen Probanden in **C** der GM und in **D** der WM. Korrelation zwischen den ATP-Spiegeln in PBMCs und der NAA Konzentration bei männlichen Probanden in **E** GM und **F** WM und bei weiblichen Probanden in **G** GM und **H** WM. $n=22-24$; p -Werte und Pearson r sind in Tabelle 4.2 dargestellt. ATP=Adenosintriphosphate; CS=Citratsynthase; GM=graue Masse; NAA=N-Acetyl-Aspartat; WM=weiße Masse.

Tabelle 4.3 Korrelationen der Werte aus dem Gehirn und den PBMCs.

	Korrelierte Werte	Pearson r	p-Werte
Männer <i>n=9</i>	NAA GM [mmol] vs. CS [IU/10 ⁶ Zellen]	0,55	0,15
	NAA WM [mmol] vs. CS [IU/10 ⁶ Zellen]	0,53	0,17
	NAA GM [mmol] vs. ATP- Spiegel [μM/10 ⁵ Zellen]	0,46	0,26
	NAA WM [mmol] vs. ATP- Spiegel [μM/10 ⁵ Zellen]	0,45	0,26
	NAA GM [mmol] vs. KI Aktivität [pmol/(s*IU CS)]	0,34	0,33
	NAA WM [mmol] vs. KI Aktivität [pmol/(s*IU CS)]	0,41	0,32
Frauen <i>n=15</i>	NAA GM [mmol] vs. CS [IU/10 ⁶ Zellen]	0,06	0,82
	NAA WM [mmol] vs. CS [IU/10 ⁶ Zellen]	0,25	0,40
	NAA GM [mmol] vs. ATP- Spiegel [μM/10 ⁵ Zellen]	0,37	0,17
	NAA WM [mmol] vs. ATP- Spiegel [μM/10 ⁵ Zellen]	0,45	0,28
	NAA GM [mmol] vs. KI Aktivität [pmol/(s*IU CS)]	0,30	0,38
	NAA WM [mmol] vs. KI Aktivität [pmol/(s*IU CS)]	0,04	0,90

ATP Adenosintri-phosphat, KI Komplex I, CS Citratsynthase, GM graue Substanz, NAA N-Acetyl-Aspartat, WM weiße Substanz

Die gleichen Methoden wurden genutzt, um die mitochondriale Funktion in PBMCs und dem Gehirn von Männern und Frauen zu vergleichen und so potenzielle geschlechtsspezifische Unterschiede zu identifizieren.

Die Citratsynthase-Aktivität der weiblichen Probanden war signifikant höher ($p=0,04$) als die der männlichen (siehe **Abbildung 4.10 A**). Auch die auf die CS normierte mitochondriale Atmung war bei den Frauen höher als bei den Männern. Die Grundatmung (endogene Atmung), die Komplex I und die Komplex II Aktivität, die oxidative Phosphorylierung sowie auch die Komplex IV Aktivität waren signifikant erhöht (siehe **Abbildung 4.10 B** und **Tabelle 4.4**). Der RCR war bei den Frauen und Männern gleich (siehe **Abbildung 4.10 C**). Die gesteigerte Aktivität der gesamten Atmungskette der weiblichen Probanden ist im Einklang mit den um 10 % höheren ATP-Spiegeln im Vergleich zu den männlichen Studienteilnehmern (siehe **Abbildung 4.10 D**). Bei den Frauen konnten ATP-Konzentrationen von $2,5 \pm 0,2 \mu\text{M ATP}/10^5$ Zellen gemessen werden, bei den Männern von $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M ATP}/10^5$ Zellen ($p=0,45$).

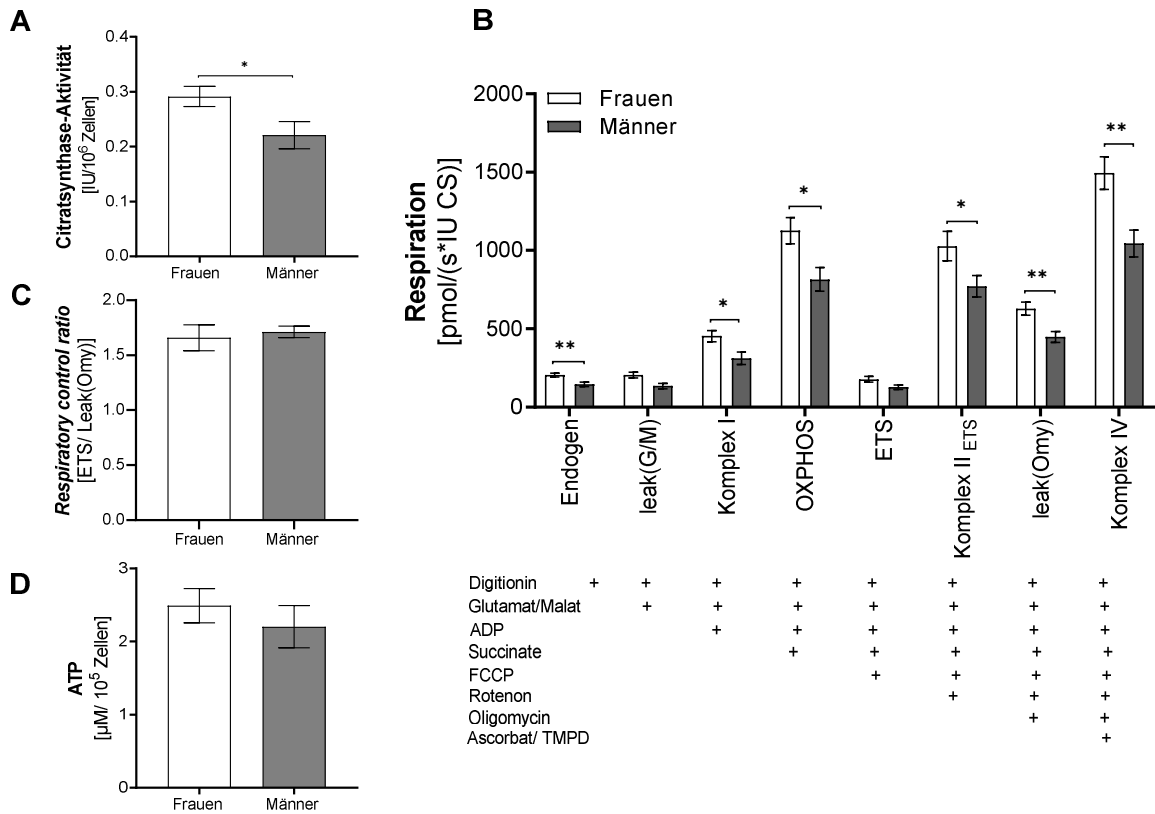


Abbildung 4.10 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in mitochondrialen Parametern in PBMCs. A Citratsynthase (CS)-Aktivität in isolierten PBMCs von weiblichen und männlichen Probanden. Die CS-Aktivität war in den Proben der Frauen signifikant höher als die der Männer. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=21$, ungepaarter t-test mit Welchs's Korrektur; $\eta^2=0,29$; $p=0,04$; ($*p<0,05$). **B Mitochondriale Respiration der isolierten PBMCs von weiblichen und männlichen Probanden.** Die Werte sind normiert auf international Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=19$; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ungepaarter t-test mit Welchs's Korrektur durchgeführt; p -Werte und die Effektstärke sind in Tabelle 4.3 dargestellt; ($*p<0,05$; $**p<0,01$). **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe bei weiblichen und männlichen Probanden. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=19$; ungepaarter t-test mit Welchs's Korrektur. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level in isolierten PBMCs von weiblichen und männlichen Probanden.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=24$, ungepaarter t-test mit Welchs's Korrektur; $\eta^2=0,04$; $p=0,4$. ATP=Adenosintriphosphate; ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

Tabelle 4.4 PECEME-Studie - Mitochondriale Komplexaktivität in isolierten PBMCs.

	Frauen n=15	Männer n=9	p-Wert	η^2
O2k-Oxygraph [pmol/ (s*IU CS)]				
Endogene Atmung	205,8±12,4	145±14,8	0,007**	0,40
KI	453,6±36,0	313±39,6	0,02*	0,30
OXPHOS	1096,0±86,4	814,5±76,1	0,03*	0,27
ETS	1028±94,8	772,2±69,1	0,04*	0,22
KII _{ETS}	612,8±42,3	448,5±34,5	0,008**	0,36
KIV	1495±104,6	1045±85,12	0,004**	0,40

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test mit Welch's Korrektur, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). η^2 Effektstärke; CS Citratsynthese K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPHOS Oxidative Phosphorylierung.

NAA ist ein Marker für den neuronalen Energieverbrauch und diente in dieser Studie deshalb als Marker für die mitochondriale Funktion im Gehirn. Auch hier zeigten die Frauen in der totalen weißen und grauen Substanz signifikant höhere NAA-Konzentrationen (GM: $p=0,009$; WM: $p=0,01$) als die Männer (siehe **Abbildung 4.11**). Die NAA-Spiegel der weiblichen Probanden lagen in der grauen Substanz bei $12,27 \pm 0,19$ mmol/L und bei den männlichen bei $11,35 \pm 0,25$ mmol/L. In der weißen Substanz zeigten die weiblichen Probanden NAA-Konzentrationen von $14,79 \pm 0,38$ mmol/L und die männlichen von $13,32 \pm 0,4$ mmol/L.

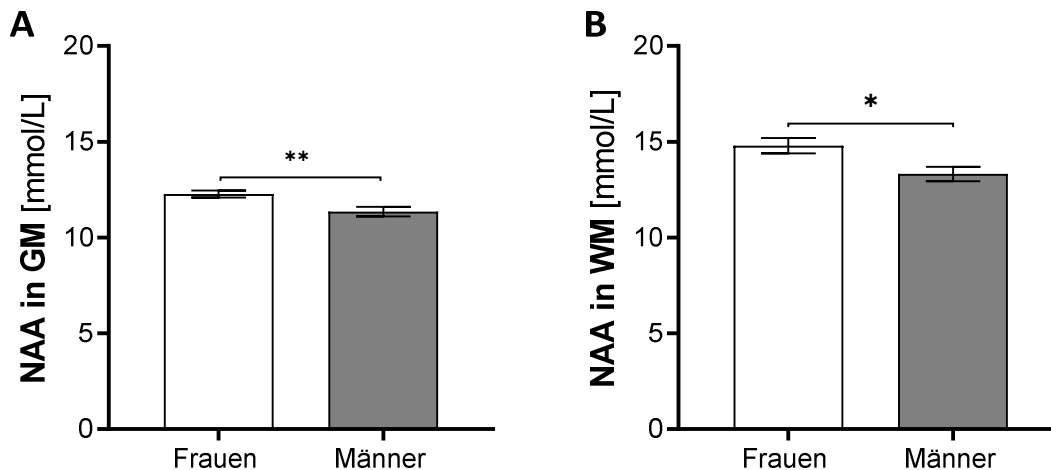


Abbildung 4.11 NAA Konzentrationen in den A graue Substanz (GM) und B weißer Substanz (WM) Regionen in weiblichen und männlichen Probanden. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=24$, ungepaarter t-test mit Welch's Korrektur; A: $\eta^2=0,35$; $p=0,009$; B: $\eta^2=0,25$; $p=0,01$; (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). GM=Graue Substanz; NAA=N-Acetyl-Aspartat; WM=weiße Substanz.

Um zu untersuchen, ob sich diese geschlechtsspezifischen Unterschiede auch auf molekular-genetischer Ebene finden, wurden Gene der mitochondrialen Biogenese und der antioxidativen Abwehr mittels real-time qPCR analysiert.

Die mRNA-Expression war bei den männlichen Probanden bei allen Genen der mitochondrialen Biogenese tendenziell höher als bei den weiblichen Probanden (siehe **Abbildung 4.12** und **Tabelle 4.5**). Dies zeigte sich ebenfalls bei der Expression für Komplex I und IV. Die Komplex V und Citratsynthase-Expression unterschieden sich zwischen den Frauen und Männern nicht.

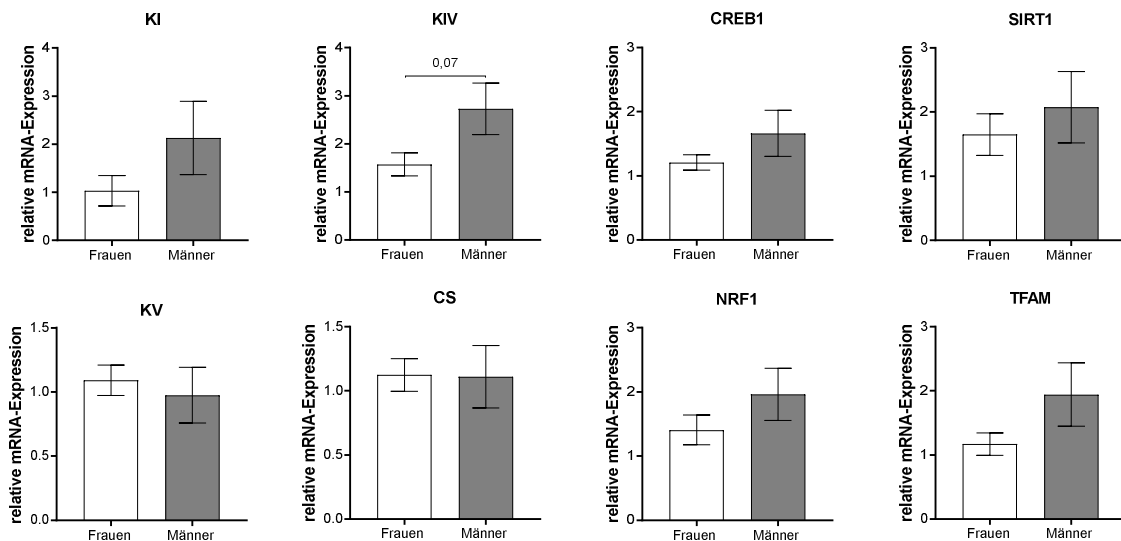


Abbildung 4.12 mRNA-Expression von Genen der mitochondrialen Biogenese. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=23$, ungepaarter t-test mit Welch's Korrektur; p -Werte sind in Tabelle 4.4 dargestellt. CREB1=*cAMP response element-binding protein*; CS=Citratsynthase; K=Komplex; NRF1=*nuclear respiratory factor 1*; SIRT1=Sirtuin 1; TFAM=mitochondrialer Transkriptionsfaktor A.

Die mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase 1 (GPx1) unterschied sich zwischen den Männern und Frauen nicht. Die männlichen Probanden zeigten allerdings eine signifikant ($p=0,049$) höhere mRNA-Expression der Superoxiddismutase 2 (SOD2) (siehe **Abbildung 4.13** und **Tabelle 4.5**).

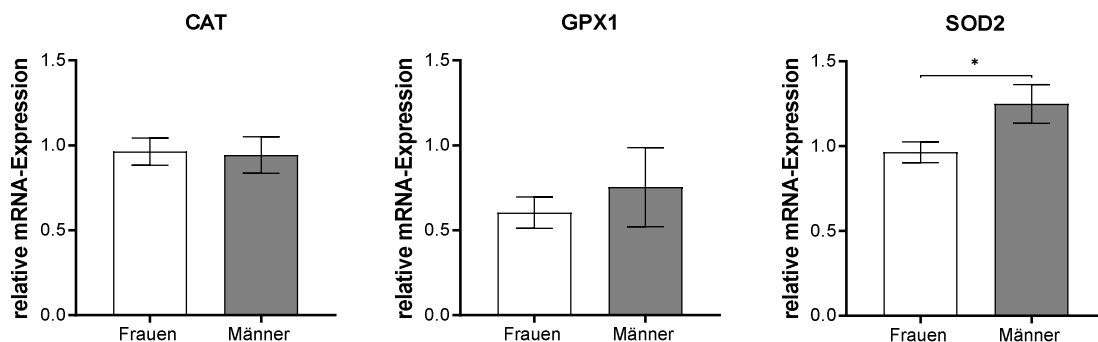


Abbildung 4.13 mRNA-Expression von Genen der antioxidativen Abwehr. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=23$, ungepaarter t-test mit Welch's Korrektur; p -Werte sind in Tabelle 4.4 dargestellt; (* $p<0,05$). CAT=Katalase; GPx1=Glutathionperoxidase 1; SOD2=Superoxiddismutase 2.

Tabelle 4.5 mRNA-Expression.

	Frauen <i>n=14</i>	Männer <i>n=9</i>	p-Wert
KI	1,03±0,32	2,13±0,76	0,21
KIV	1,57±0,24	2,73±0,54	0,07
KV	1,09±0,12	0,98±0,22	0,65
CS	1,24±0,13	1,11±0,24	0,96
CREB1	1,21±0,12	1,66±0,36	0,26
SIRT1	1,65±0,32	2,08±0,56	0,52
NRF1	1,41±0,75	1,96±0,41	0,26
TFAM	1,17±0,90	1,94±0,49	0,17
GPX1	0,60±0,09	0,75±0,23	0,89
SOD2	0,96±0,06	1,25±0,11	0,05*
CAT	0,96±0,08	0,94±0,11	0,88

*Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test mit Welch's Korrektur, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; (*p<0.05). CAT Catalase CREB1 cAMP response element-binding protein CS Citratsynthase K Komplex GPX1 Glutathionperoxidase 1 NRF1 Nuclear respiratory factor 1 SIRT1 Sirtuin 1 SOD Superoxidismutase TFAM mitochondrial transcription factor A.*

4.2.2 Studie 2: Etablierung von Biomarkern zur Erfassung des peripheren und zerebralen Energiemetabolismus im Alter (PECEMA-Studie)

Nach der Erforschung der geschlechtsassoziierten Unterschiede in der PECEME-Studie sollten in der PECEMA-Studie die altersassoziierten Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs von gesunden jungen und alten Probanden untersucht werden. Dadurch sollte eruiert werden, ob auch bei gesunden älteren Personen mit dieser Methode schon Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion identifiziert werden können.

Dazu wurden, wie auch bereits in der PECEME-Studie, mitochondriale Parameter wie die ATP-Spiegel, die Citratsynthase-Aktivität und die Atmungsaktivität mittels hochauflösender Respirometrie in isolierten PBMCs analysiert.

Bei der Citratsynthase-Aktivität konnten weder bei Frauen noch bei den Männern altersbedingte Unterschiede detektiert werden (siehe **Abbildung 4.14 A**). Auch die Fähigkeit der Nutzung des Protonengradienten für die ATP-Produktion (RCR) war bei den weiblichen und

männlichen Probanden sowohl in der jungen, als auch in der alten Gruppe gleich (siehe **Abbildung 4.14 C**). Die auf die Citratsynthase normierte mitochondriale Komplexaktivität war in fast allen Stadien zwischen den Altersgruppen gleich. Beim Komplex IV konnte eine altersassoziierte signifikante Abnahme der Aktivität sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern beobachtet werden (Frauen: $p=0,03$; Männer: $p=0,04$) (siehe **Abbildung 4.14 B** und **Tabelle 4.6**). Diese altersbedingte, niedrigere Komplex IV Aktivität führt zu einer geringeren ATP-Produktion. Die gemessenen ATP-Spiegel waren in der der alten Gruppe sowohl bei den Frauen ($p=0,04$) als auch bei den Männern ($p=0,03$) im Vergleich zur jungen Gruppe signifikant niedriger (siehe **Abbildung 4.14 D**).

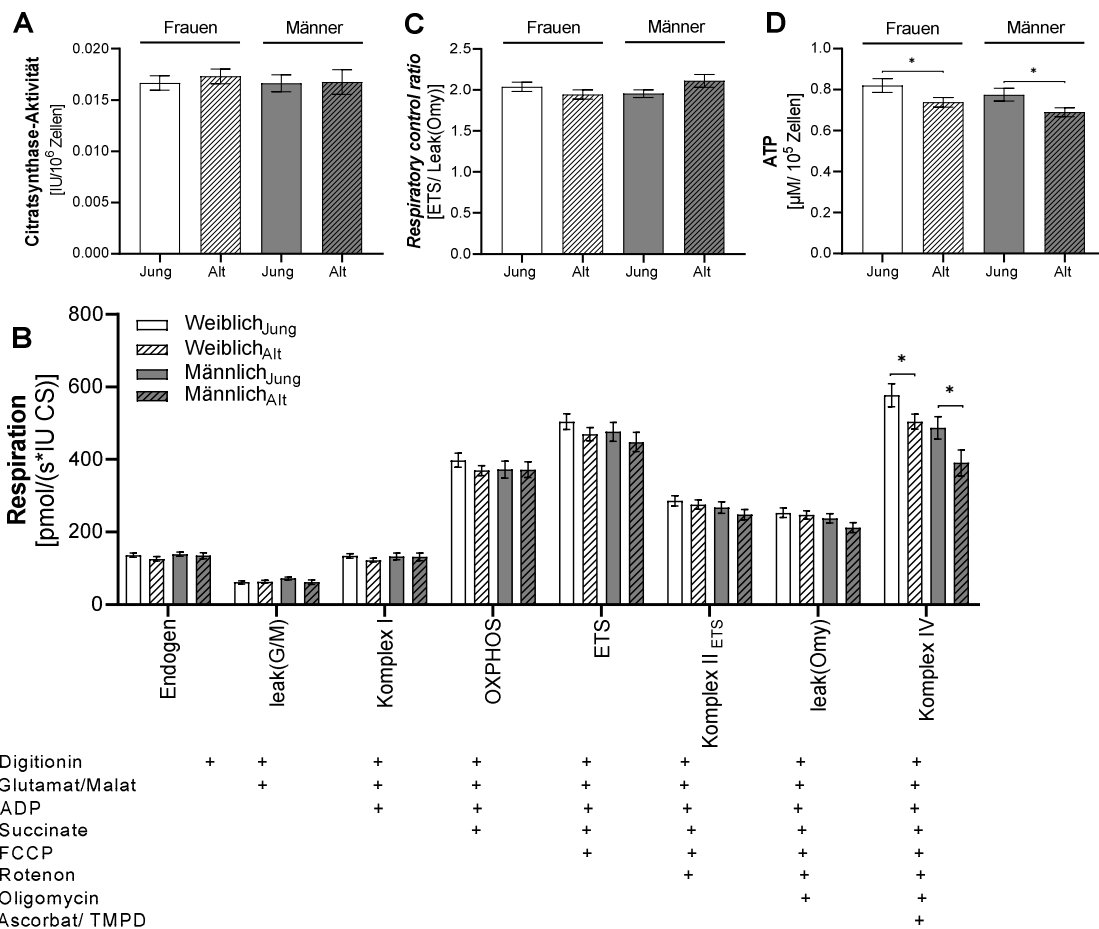


Abbildung 4.14 Altersassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs. A Aktivität des mitochondrialen Massemarker Citratsynthase (CS). Die Aktivität der CS unterschied sich zwischen den jungen und alten Frauen sowie zwischen den jungen und alten Männern nicht. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=115$; ungepaarter t-test. **B Mitochondriale Atmung der isolierten PBMCs von weiblichen und männlichen, jungen und alten Probanden gemessen mit high-resolution Respirometrie.** Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=115$; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt; p -Werte sind in Tabelle 4.5 dargestellt (* $p<0.05$). **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe bei weiblichen und männlichen, jungen und alten Probanden. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=115$; ungepaarter t-test. **D Zellzahl normalisierte ATP-**

Level. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=130$, ungepaarter t-test; Frauen: $p=0,04$; Männer: $p=0,03$; ($*p<0.05$). ATP = Adenosinriphosphate; ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektro-
nentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone; G=Glutamat;
M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre
Blutzellen; RCR=*Respiratory control ratio*; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

Tabelle 4.6 PECEMA-Studie - Mitochondriale Komplexaktivität.

Probanden	Frauen n=59		p-value	Männer n=57		p-value
	Jung n=28	Alt n=31		Jung n=29	Alt n=28	
Gruppe						
O2k-Oxygraph [pmol/(s*IU CS)]						
Endogene At- mung	136,6±6,00	125,8±6,26	0,22	138,8±6,06	134,7±8,08	0,68
KI	134,2±5,85	122,4±5,11	0,13	133,0±9,31	131,7±10,57	0,93
OXPHOS	398,0±19,65	369,3±13,48	0,23	372,3±23,06	372,0±21,46	0,99
ETS	504,1±21,65	469,9±18,29	0,23	476,2±25,82	447,9±26,23	0,44
KII_{ETS}	286,1±14,49	275,5±12,59	0,58	267,5±16,14	248,1±14,58	0,38
KIV	577,0±32,09	497,8±19,79	0,03*	487,5±30,98	390,8±35,69	0,04*

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; ($*p<0.05$).
CS Citratsynthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPHOS Oxidative Phosphorylierung.

4.2.3 Studie 3: Multimodale Strategien zur Prävention der Alzheimer Er- krankung (MIND ADmini-Studie)

In dieser randomisiert kontrollierten, multizentralen Studie mit Patienten mit milden kognitiven Beeinträchtigungen sollte untersucht werden, wie sich eine sechsmonatige multimodale Intervention (Kognition, Ernährung und Bewegung) auf die kognitive und mitochondriale Funktion ausübt und welchen Einfluss sie auf metabolische Parameter wie Cholesterin, Interleukine, Triglyceride und den Omega-3-Index hat.

Dazu wurden vor (*Visit 1*) und nach (*Visit 2*) der Intervention anthropometrische und metabo-
lische Parameter bestimmt sowie die mitochondriale Funktion in PBMCs gemessen. Die Daten
der kognitiven und physischen Untersuchungen sind nicht Teil dieser Arbeit.

4.2.3.1 Einfluss der multimodalen Intervention auf metabolische Parameter

Das Gewicht sowie der Waist-Hip-Ratio wurden bei den beiden Interventionsgruppen *Lifestyle*
und *Lifestyle&Food* beim *Visit 1* und *Visit 2* erfasst sowie im Rahmen der individuellen Ernäh-
rungsberatung nach drei und vier Monaten (siehe **Abbildung 4.15**). Bei der *Lifestyle*-Gruppe

zeigten sich weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Probanden Veränderungen bezüglich des Gewichts oder des Waist-Hip-Ratio. Bei der *Lifestyle&Food*-Gruppe zeigte sich bei den weiblichen ($p=0,09$) und männlichen Probanden ($p=0,05$) eine leichte Gewichtszunahme zwischen *Visit 1* und *Visit 2*. Bei der Messung des Waist-Hip-Ratios konnten keine Veränderungen beobachtet werden.

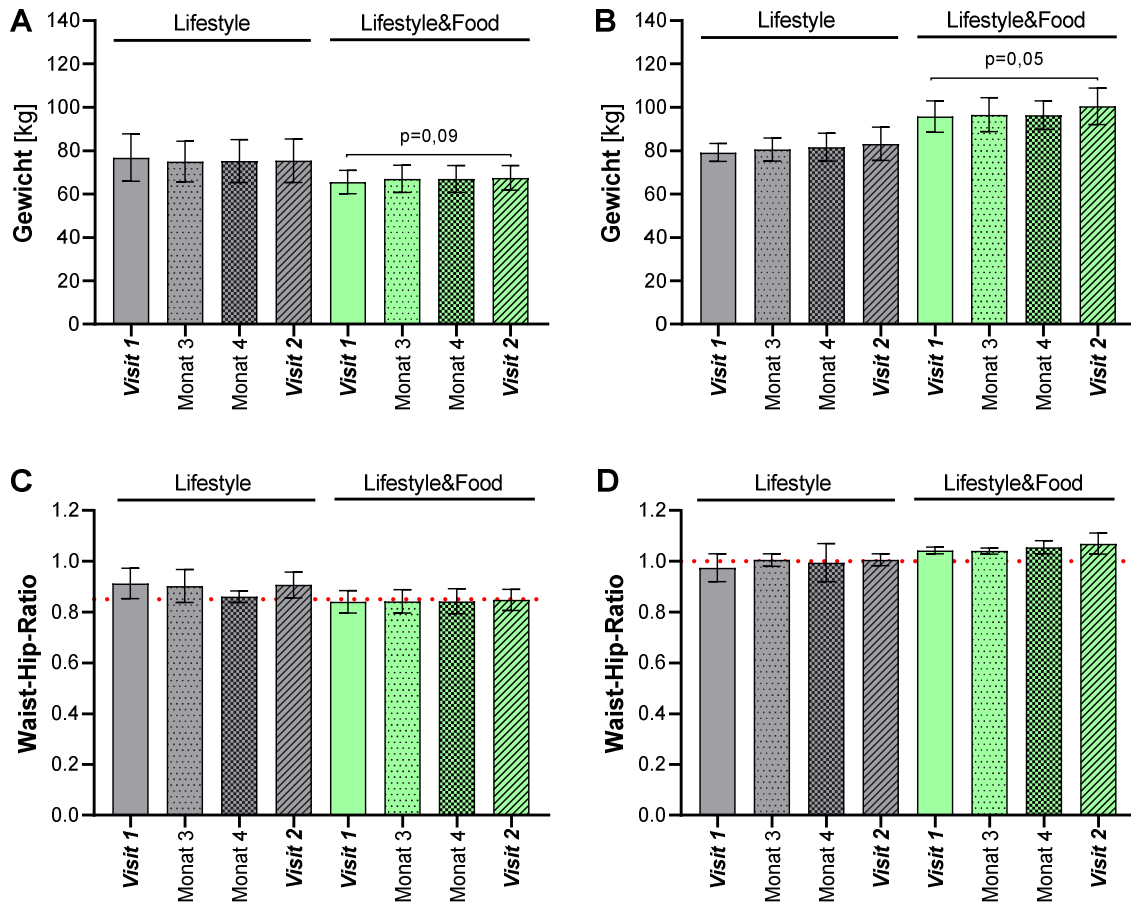


Abbildung 4.15 Anthropometrische Daten. Gewichtsverlauf der **A** weiblichen Probanden und **B** männlichen Probanden der Interventionsgruppen beim *Visit 1*, nach 3 und 4 Monaten und beim *Visit 2*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=22$; ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test. **C** Waist-Hip-Ratio der weiblichen Probanden und **D** der männlichen Probanden beim *Visit 1*, nach 3 und 4 Monaten und beim *Visit 2*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=22$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test. Die rote Linie ist der Grenzwert, ab dem das Risiko für Adipositas-assoziierte metabolische Komplikation steigt.

Für die Untersuchung der multimodalen Intervention auf metabolische Parameter wurde eine umfangreiche Blutanalyse durchgeführt. Bei der Bestimmung der Cholesterinwerte zeigte sich bei der Kontroll-Gruppe ein leichter Anstieg von *Visit 1* zu *Visit 2* ($p=0,06$). Bei der *Lifestyle&Food*-Gruppe, die im Rahmen der Intervention täglich einen mit Omega-3- Fettsäuren angereicherten Drink auf Milchbasis verzehren musste, kam es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtcholesterinwerte von *Visit 1* zu *Visit 2* ($p=0,009$). Die HDL-Fraktion des Cholesterins war in signifikant höheren Konzentrationen beim *Visit 2* vorhanden ($p=0,02$), die LDL-

Fraktion zeigte nur eine Tendenz zu höheren Werten ($p=0,08$). Bei der *Lifestyle*-Gruppe blieben die Cholesterinwerte unverändert. Bei der Bestimmung des Verhältnisses von LDL- zu HDL-Cholesterin (**Abbildung 4.16 B**) sowie der Triglycerid-Gehalte im Blut (**Abbildung 4.16 E**) konnten in allen drei Gruppen keine Veränderungen gemessen werden. Die Konzentrationen des Entzündungsmarkers Interleukin-6 blieben bei der Kontrollgruppe unverändert. Bei der *Lifestyle*-Gruppe lagen die Werte im Vergleich zum *Visit 1* beim *Visit 2* tendenziell etwas höher ($p=0,05$). Die Werte der *Lifestyle&Food*-Gruppe waren beim *Visit 2* ebenfalls tendenziell etwas erhöht ($p=0,2$). Alle weiteren Ergebnisse der Blutuntersuchungen sind in **Tabelle A1** im Anhang dargestellt.

Alle drei Gruppen bekamen für die sechsmonatige Intervention die Empfehlung einer mediterranen Ernährungsform (siehe **1.4.1**). Die Interventionsgruppen wurden in den monatlichen Einzel- und Gruppenernährungsberatungen angehalten, ihre Zufuhr an Omega-3-Fettsäure reichen Lebensmitteln zu steigern. Zudem mussten die Probanden der *Lifestyle&Food*-Gruppe täglich einen mit Omega-3-Fettsäuren angereicherten Drink verzehren. Aus diesem Grund wurde bei allen Probanden zum *Visit 1* und *2* eine Analyse des Fettsäureprofils durchgeführt (siehe **Abbildung 4.17**). Zusätzlich wurde der HS-Omega-3-Index bestimmt (**Abbildung 4.18**). Dieser spiegelt das Verhältnis der Omega-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) zueinander wider.

Die Konzentration der Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA waren nach der sechsmonatigen Intervention in der *Lifestyle&Food*-Gruppe signifikant erhöht (EPA: $p=0,01$; DHA: $p=0,002$) (siehe **Abbildung 4.17 A**). Bei der Kontroll-Gruppe und bei der *Lifestyle*-Gruppe konnten bei diesen beiden Fettsäuren keine Unterschiede zwischen *Visit 1* und *Visit 2* detektiert werden. Der Unterschied zwischen dem DHA-Spiegel der *Lifestyle* und der *Lifestyle&Food*-Gruppe war signifikant. Die Konzentrationen der γ -Linolensäure der Kontroll-Gruppe lagen bei *Visit 1* ($p=0,008$) und *Visit 2* ($p=0,02$) signifikant höher als bei der *Lifestyle*-Gruppe (siehe **Abbildung 4.17 B**). Die anderen Gruppen unterschieden sich weder bei der γ - noch bei der α -Linolensäure und auch innerhalb der Gruppen konnte durch die Intervention keine Veränderung erreicht werden. Die Ölsäure- und Linolsäure-Spiegel unterschieden sich weder innerhalb der Gruppen noch zwischen den Gruppen (siehe **Abbildung 4.17 C**).

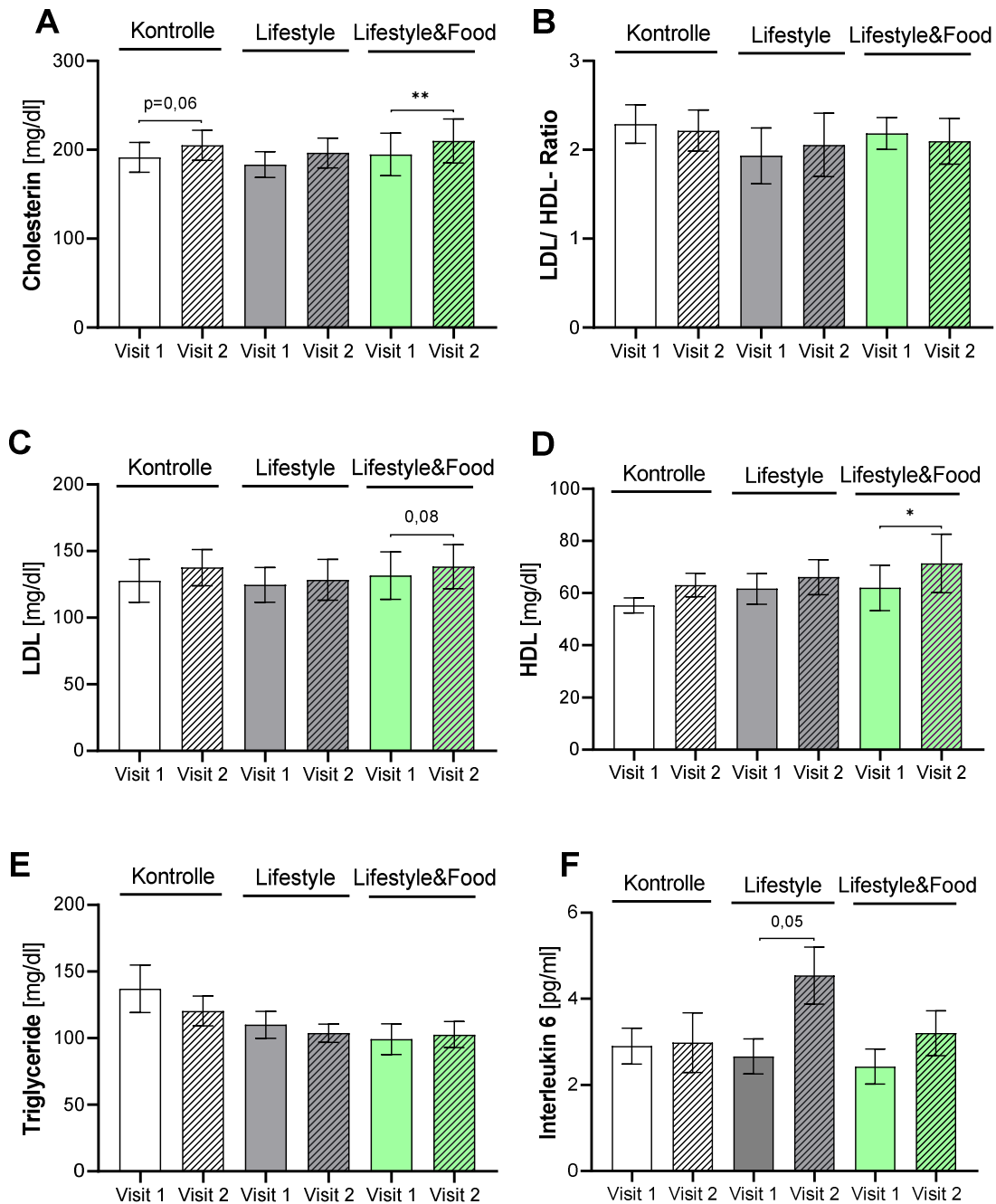


Abbildung 4.16 Ergebnisse der Bestimmung der Blutparameter. A Cholesterin B LDL/HDL-Ratio C LDL und D HDL E Triglyceride und F Interleukin-6. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=22$; gepaarter t-test; **A:** Ko: $p=0,06$, L&F: $p=0,009$; **C:** L&F: $p=0,08$; **D:** L&F: $p=0,02$; **F:** Ls: $p=0,05$; (* $p<0,05$; ** $p<0,01$); HDL=High density lipoprotein; Ko=Kontrolle; LDL=low density lipoprotein; Ls=Lifestyle; L&F=Lifestyle&Food.

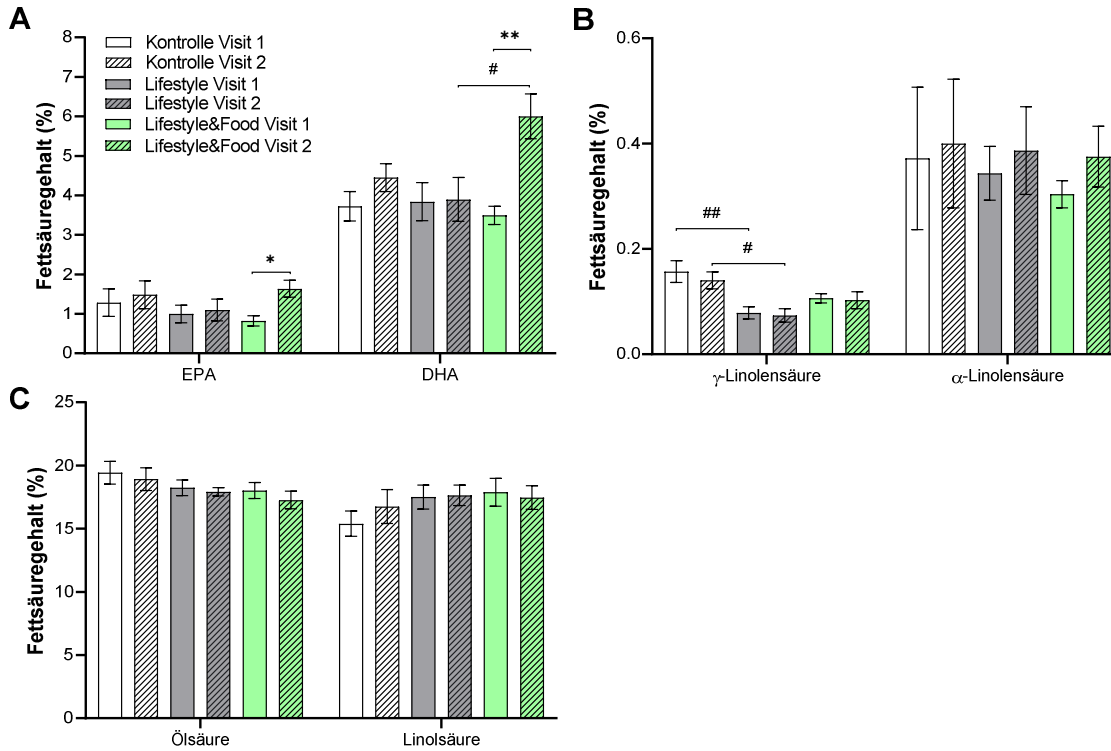


Abbildung 4.17 Ergebnisse der Bestimmung des Fettsäureprofils in Erythrozyten. A Konzentration der Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=22$; gepaarter t-test oder ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test; EPA: $p=0,01$; DHA: $p=0,002$; #: $p=0,01$ ($*p<0,05$; $\#p<0,05$; $**p<0,01$). **B Konzentrationen der Fettsäuren γ - und α -Linolensäure.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=22$; gepaarter t-test oder ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test; $p=0,008$; #: $p=0,02$ ($\#p<0,05$; $##p<0,01$). **C Konzentrationen der Fettsäuren Ölsäure und Linolsäure.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=22$; gepaarter t-test oder ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test. DHA=Docosahexaensäure; EPA=Eicosapentaensäure.

Zu Beginn der Studie lag der HS-Omega-3-Index bei allen Probanden auf einem ähnlichen Niveau (siehe **Abbildung 4.18 A**) (Ko: 5,95 %; Ls: 7 %; L&F: 5,8 %). Nach der Intervention war der Omega-3-Index der *Lifestyle&Food*-Gruppe im Vergleich zur *Lifestyle*-Gruppe signifikant erhöht ($p=0,01$). Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe wies die Gruppe mit dem Omega-3-FS Drink einen höheren Omega-3-Index auf ($p=0,08$). Nach sechs Monaten zeigte die Kontrollgruppe tendenziell höhere Omega-3-Spiegel im Blut, allerdings war der Anstieg nicht signifikant ($p=0,06$) (siehe **Abbildung 4.18 B**). Bei der *Lifestyle*-Gruppe konnte keine Verbesserung des Omega-3-Indexes durch die sechsmonatige Intervention detektiert werden. Bei der *Lifestyle&Food*-Gruppe kam es wie erwartet zu einem signifikanten Anstieg des Omega-3-Indexes von *Visit 1* zu *Visit 2* ($p<0,001$).

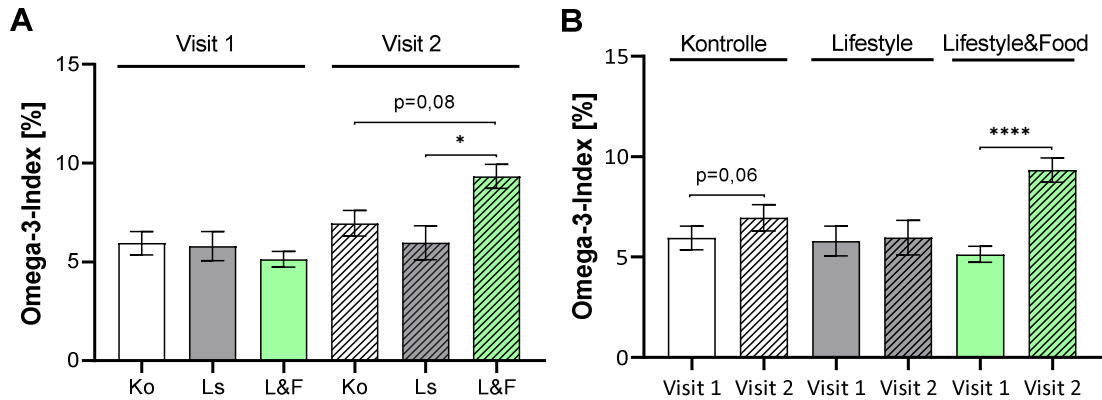


Abbildung 4.18 Ergebnisse der Bestimmung des HS- Omega-3-Index in Erythrozyten. A Vergleich des HS-Omega-3-Indexes zwischen den Gruppen Ko, Ls und L&F beim *Visit 1* und nach der sechsmonatigen Intervention beim *Visit 2*. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test; $n=22$; *Visit 2*: Ko vs. Ls: $p=0,71$ Ko vs. L&F: $p=0,08$; Ls vs. L&F: $p=0,01$. (* $p<0,05$). **B Vergleich des HS-Omega-3-Index beim *Visit 1* und *Visit 2*.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=22$; gepaarter t-test; Ko: $p=0,06$, Ls: $p=0,47$; L&F: $p<0,001$ (**** $p<0,001$). Ko=Kontrolle; Ls=Lifestyle; L&F=Lifestyle&Food.

4.2.3.2 Einfluss der multimodalen Intervention auf die mitochondriale Funktion

Neben dem Einfluss auf die metabolischen Parameter sollte ebenfalls untersucht werden, welche Auswirkungen die Intervention auf die mitochondriale Funktion der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) hat. Nach dem *Visit 1* wurden die inkludierten Probanden gleichmäßig auf die drei Gruppen randomisiert. Trotz der zufälligen Einteilung in die Gruppen zeigten sich zum *Visit 1* keine signifikanten Unterschiede bei der Citratsynthase-Aktivität zwischen den einzelnen Gruppen (siehe **Abbildung 4.19 A**). Auch bei der mitochondrialen Atmung sowie beim RCR konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden (siehe **Abbildung 4.19 B** und **C**). Die ATP-Spiegel unterschieden sich passend zu den anderen Ergebnissen ebenfalls nicht (siehe **Abbildung 4.19 D**). Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um die Gruppen nach der sechsmonatigen Intervention auch untereinander vergleichen zu können.

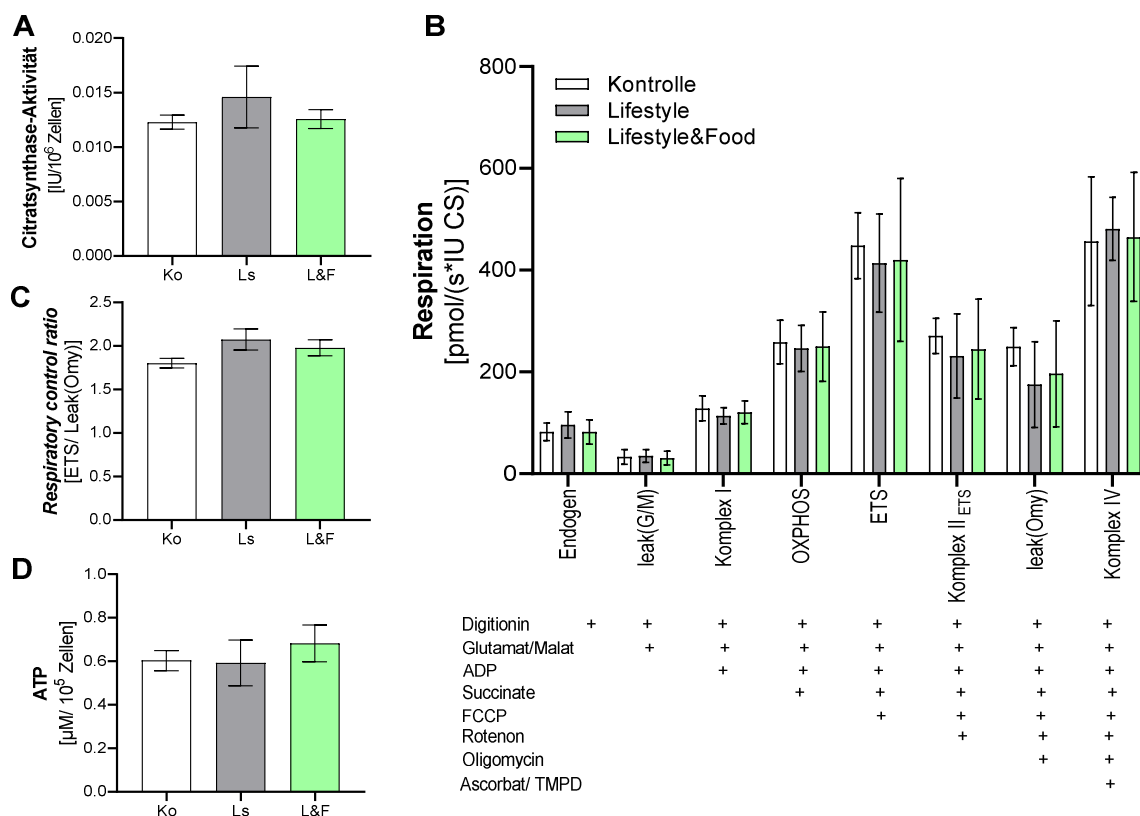


Abbildung 4.19 Ergebnisse der Untersuchungen der mitochondrialen Funktion beim Visit 1. A Citratsynthase (CS)-Aktivität in isolierten PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=24$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test. **B Mitochondriale Respiration der isolierten PBMCs.** Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=24$; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test durchgeführt. **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=24$; ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level in isolierten PBMCs.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=24$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test. ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; Ko=Kontrolle; Ls=Lifestyle; L&F=Lifestyle&Food; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

Nach Abschluss der sechsmonatigen Intervention wurde erneut die mitochondriale Funktion in den PBMCs untersucht. Die Intervention führte zu keiner Erhöhung der Citratsynthase-Aktivität bei der *Lifestyle*- oder *Lifestyle&Food*-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (siehe **Abbildung 4.20 A**). Es konnte auch kein Unterschied innerhalb der Gruppen zwischen *Visit 1* und *Visit 2* festgestellt werden. Die auf die CS normierte mitochondriale Komplexaktivität unterschied sich zwischen den drei Gruppen nicht (siehe **Abbildung 4.20 B** und **Tabelle A2**). Die Grundatmung (Endogen) war bei der Kontrollgruppe nach den sechs Monaten signifikant erhöht. Im Stadium der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) konnte bei allen drei Gruppen ein signifikanter Anstieg der Aktivität im Vergleich zum *Visit 1* detektiert werden (Ko: $p=0,0002$ Ls: $p=0,02$ L&F: $p=0,005$), wohingegen die Komplex IV Aktivität bei allen Gruppen signifikant

niedriger war (Ko: $p=0,005$ LS: $p=0,01$ L&F: $p=0,04$). Bei allen anderen Stadien konnten keine Unterschiede zum *Visit 1* gemessen werden. Auch bei der RCR zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder im Vergleich zum *Visit 1* (siehe **Abbildung 4.20 C**). Trotz des signifikanten Abfalls der Komplex IV-Aktivität kam es weder innerhalb noch zwischen den Gruppen zu einer Abnahme der ATP-Konzentrationen (siehe **Abbildung 4.20 D**).

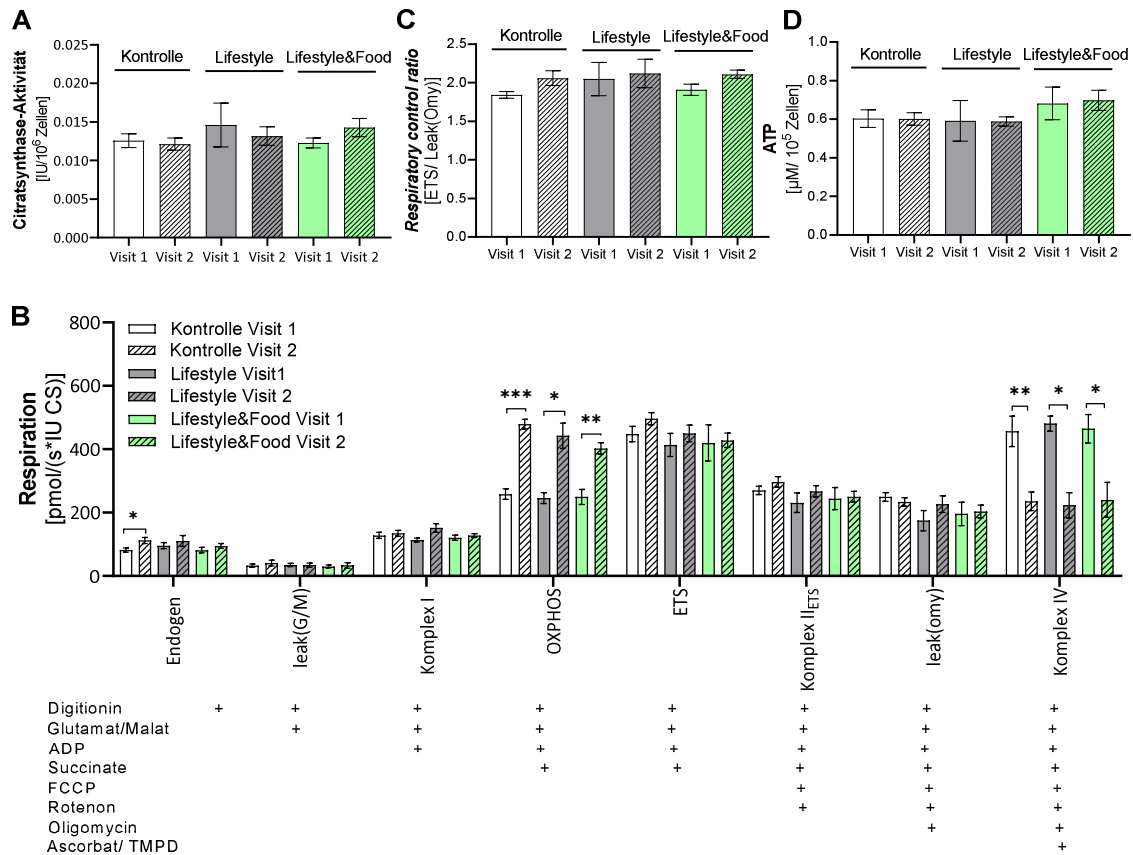


Abbildung 4.20 Einfluss der sechsmonatigen Intervention auf die mitochondriale Funktion. A Citratsynthase (CS)-Aktivität in isolierten PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=22$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. **B Mitochondriale Respiration der isolierten PBMCs.** Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=22$; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test durchgeführt; Endogen: Ko: $p=0,03$; OXPHOS: Ko: $p=0,0002$ LS: $p=0,02$ L&F: $p=0,005$; KIV: Ko: $p=0,005$ LS: $p=0,01$ L&F: $p=0,04$; (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=22$; ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level in isolierten PBMCs.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=22$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; Ko=Kontrolle; Ls=Lifestyle; L&F=Lifestyle&Food; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

Im **Kapitel 4.2.1** werden geschlechtsspezifische Unterschiede in der mitochondrialen Funktion beschrieben. Aus diesem Grund sind in **Abbildung 4.21** die Ergebnisse der sechsmonatigen Intervention bei Frauen und in **Abbildung 4.22** bei Männern dargestellt.

Die Intervention führte zu keiner Erhöhung der Citratsynthase-Aktivität bei den weiblichen Studienteilnehmern der *Lifestyle*- oder *Lifestyle&Food*-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (siehe **Abbildung 4.21 A**). Es konnte auch kein Unterschied innerhalb der Gruppen zwischen *Visit 1* und *Visit 2* festgestellt werden. Die auf die CS normierte mitochondriale Komplexaktivität unterschied sich zwischen den drei Gruppen nicht (siehe **Abbildung 4.21 B**). Die Grundatmung (Endogen) war auch bei den Frauen der Kontrollgruppe nach den sechs Monaten signifikant erhöht. Im Stadium der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) konnte bei der Kontrollgruppe sowie bei der *Lifestyle*-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Aktivität im Vergleich zum *Visit 1* detektiert werden (Ko: $p=0,004$ LS: $p=0,02$), wohingegen die Komplex IV Aktivität bei den beiden Gruppen signifikant niedriger war (Ko: $p=0,006$ LS: $p=0,01$). Bei allen anderen Stadien konnten keine Unterschiede zum *Visit 1* gemessen werden. Auch bei der RCR zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder im Vergleich zum *Visit 1* (siehe **Abbildung 4.21 C**). Trotz des signifikanten Abfalls der Komplex IV-Aktivität bei der Kontroll- und *Lifestyle*-Gruppe kam es weder innerhalb, noch zwischen den Gruppen zu einer Abnahme der ATP-Konzentrationen (siehe **Abbildung 4.21 D**).

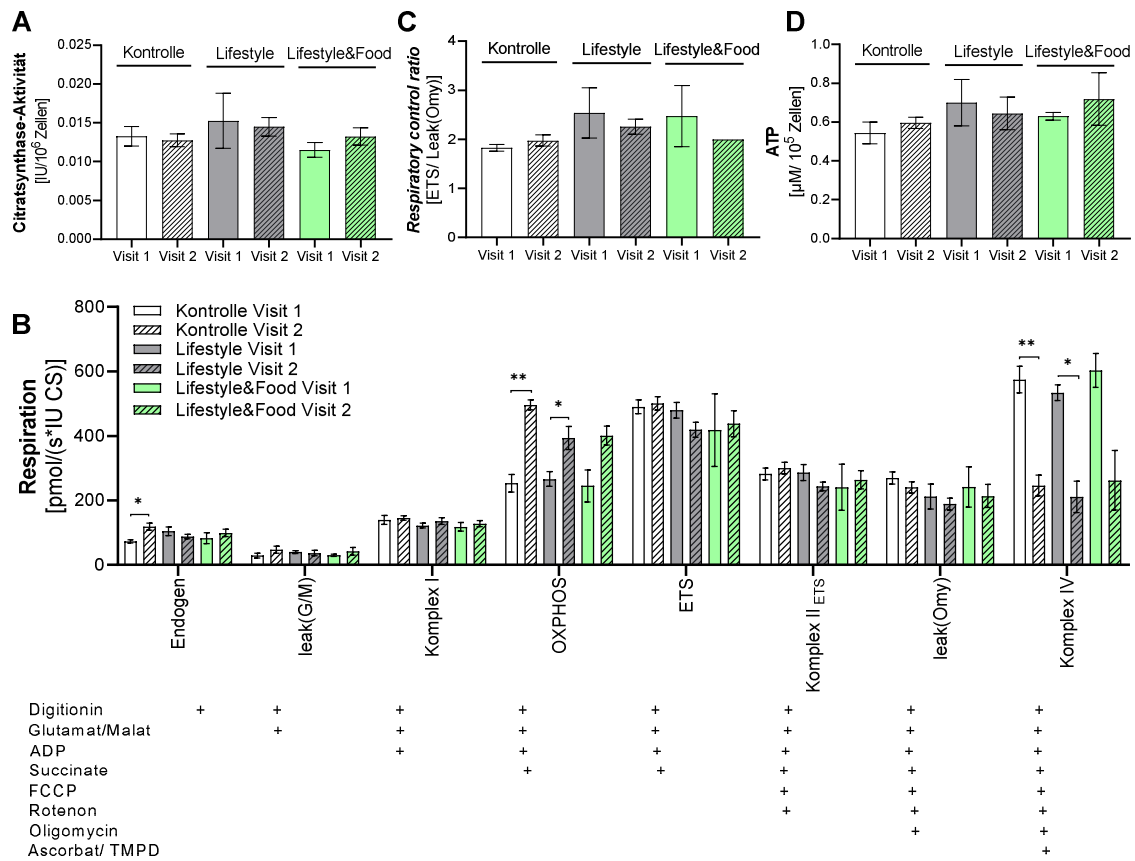


Abbildung 4.21 Einfluss der sechsmonatigen Intervention auf die mitochondriale Funktion bei Frauen. A Citratsynthase (CS)-Aktivität in isolierten PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=12$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. **B Mitochondriale Respiration der isolierten PBMCs.** Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=13$; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test durchgeführt; Endogen: Ko: $p=0,04$; OXPHOS: Ko: $p=0,004$ LS: $p=0,02$; KIV: Ko: $p=0,005$ LS: $p=0,02$; (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). **C Respiratory Control Ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; $n=13$; ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level in isolierten PBMCs.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=13$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder ein gepaarter t-test. ADP=Adenosindiphosphat; CS= Citratsynthase; ETS= Elektronentransportsystem; FCCP= Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; Ko = Kontrolle; Ls = Lifestyle; L&F= Lifestyle&Food; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS= oxidative Phosphorylierung; PBMC= Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR= Respiratory control ratio; TMPD= Tetramethylphenylendiamin.

Auch bei den männlichen Probanden führte die Intervention zu keiner Erhöhung der Citratsynthase-Aktivität bei der *Lifestyle*- oder *Lifestyle&Food*-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (siehe **Abbildung 4.22 A**). Es konnte auch kein Unterschied innerhalb der Gruppen zwischen *Visit 1* und *Visit 2* festgestellt werden. Die auf die CS normierte mitochondriale Komplexaktivität unterschied sich zwischen den drei Gruppen nicht (siehe **Abbildung 4.22 B**). Im Stadium der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) konnte bei der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Aktivität im Vergleich zum *Visit 1* detektiert werden (Ko: $p=0,007$ L&F: $p=0,07$), wohingegen die Komplex IV Aktivität bei der *Lifestyle&Food*-Gruppen signifikant niedriger war

(L&F: $p=0,01$). Bei allen anderen Stadien konnten keine Unterschiede zum *Visit 1* gemessen werden. Auch bei der RCR zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder im Vergleich zum *Visit 1* (siehe **Abbildung 4.22 C**). Bei der ATP-Konzentration kam es ebenfalls zu keiner Veränderung. Die Werte der Gruppen vom *Visit 1* zum *Visit 2* sowie die ATP-Konzentrationen zwischen den Gruppen unterschieden sich nicht (siehe **Abbildung 4.22 D**).

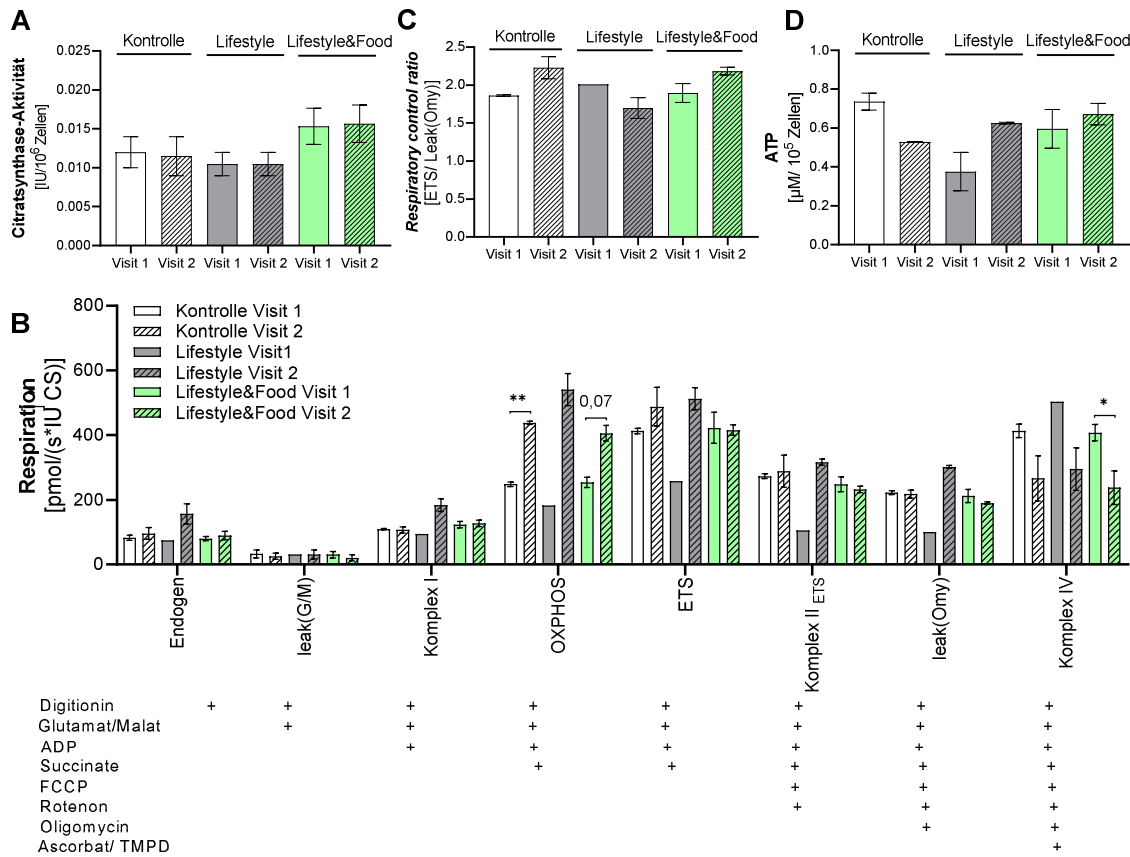


Abbildung 4.22 Einfluss der sechsmonatigen Intervention auf die mitochondriale Funktion bei Männern. A Citratsynthase (CS)-Aktivität in isolierten PBMCs. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=7$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. **B Mitochondriale Respiration der isolierten PBMCs.** Die Werte sind normiert auf international Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; $n=6$; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test durchgeführt; OXPHOS: Ko: $p=0,008$ L&F: $p=0,07$; KIV: L&F: $p=0,01$; (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; $n=6$; ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level in isolierten PBMCs.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, $n=9$, ordinary one-way ANOVA mit Sidak's multiple comparison test oder gepaarter t-test. ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; Ko=Kontrolle; Ls=Lifestyle; L&F=Lifestyle&Food; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

4.3 Geschlechts- und altersassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion

4.3.1 Zusammenfassung der geschlechtsassoziierten Unterschiede der mitochondrialen Funktion der verschiedenen Studien

In allen durchgeführten Studien wurden immer weibliche und männliche Probanden rekrutiert, da in der PECEME-Studie ein geschlechtsassoziiertes Unterscheid in der mitochondrialen Funktion in PBMCs detektiert werden konnte. Deshalb wurden hier die Ergebnisse der Melatonin-, MIND AD_{mini}- und PECEMA-Studie explizit auf geschlechtsassoziierte Unterschiede untersucht. Bei der Melatoninstudie wurden die Ergebnisse der Messung um 14 Uhr verwendet, um einen möglichen Einfluss von Melatonin auszuschließen. Bei der MIND AD_{mini}-Studie wurden die Daten vom ersten Besuch verwendet, da hier noch keine Intervention stattgefunden hatte. Bei der PECEMA-Studie wurden die Frauen und Männer in der gleichen Altersgruppe miteinander verglichen.

Bei allen drei Studien konnten keine Unterschiede in der Citratsynthase-Aktivität beobachtet werden (siehe **Abbildung 4.23 A**, **Abbildung 4.24 A** und **Abbildung 4.25 A**). Auch der RCR war zwischen den weiblichen und männlichen Probanden unverändert (siehe **Abbildung 4.23 C**, **Abbildung 4.24 C** und **Abbildung 4.25 C**). Bei der mitochondrialen Respiration konnten geschlechtsassoziierte Unterschiede beobachtet werden. Bei den weiblichen Probanden konnte bei allen Studien eine signifikant höhere Komplex IV-Aktivität beobachtet werden (siehe **Abbildung 4.23 B**, **Abbildung 4.24 B** und **Abbildung 4.25 B**). Bei der Melatonin-Studie war außerdem die Komplex II-Aktivität der Frauen signifikant höher ($p=0,04$) als bei den Männern (siehe **Abbildung 4.23 B** und **Tabelle 4.7**). Bei den weiblichen MCI-Patienten der MIND AD_{mini}-Studie war die maximale Atmung (ETS) signifikant ($p=0,04$) höher als bei den gleichaltrigen, männlichen Patienten (siehe **Abbildung 4.24 B** und **Tabelle 4.8**).

Die ATP-Spiegel der weiblichen Probanden waren in allen Studien bei den weiblichen Probanden tendenziell höher als bei den männlichen (siehe **Abbildung 4.23 D**, **Abbildung 4.24 D** und **Abbildung 4.25 D**). Bei der Melatoninstudie waren die ATP-Spiegel der Frauen 22 % höher als die der Männer ($p=0,05$). Bei der MIND AD_{mini}-Studie lag der Unterschied bei 11 %. Bei der PECEMA-Studie zeigten die jungen Frauen eine ca. 6 % höhere ATP-Konzentration, die alten Frauen wiesen ca. 7 % höhere ATP-Spiegel auf.

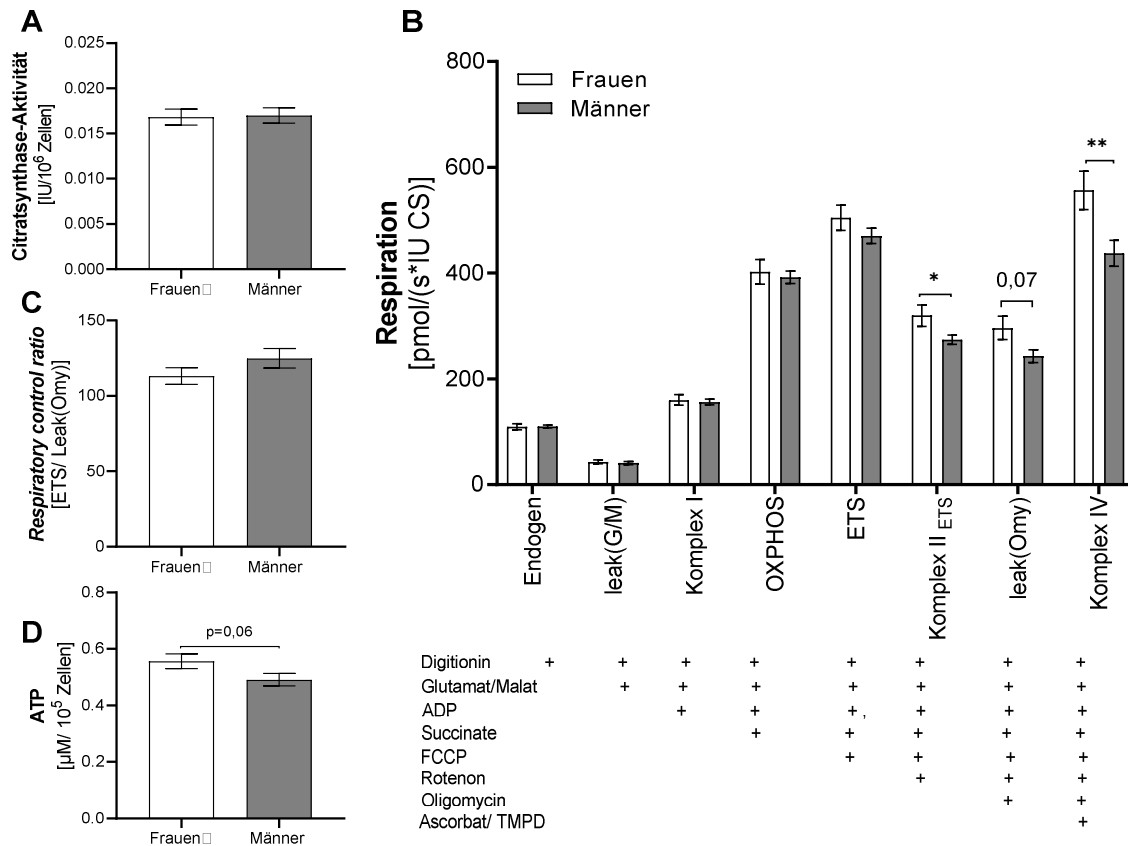


Abbildung 4.23 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs von jungen Probanden. A Aktivität des mitochondrialen Massemarker Citratsynthase (CS). Die Aktivität der CS unterscheidet sich zwischen den weiblichen und männlichen jungen Probanden nicht. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; *n*=20; ungepaarter t-test. **B** Mitochondriale Atmung der isolierten PBMCs von weiblichen und männlichen, jungen Probanden gemessen mit high-resolution Respirometrie. Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; *n*=20; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt; *p*-Werte sind in Tabelle 4.7 dargestellt (**p*<0,05; ***p*<0,01). **C** Respiratory control ratio berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe bei weiblichen und männlichen MCI-Patienten. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; *n*=20; ungepaarter t-test. **D** Zellzahl normalisierte ATP-Level. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, *n*=20, ungepaarter t-test. ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

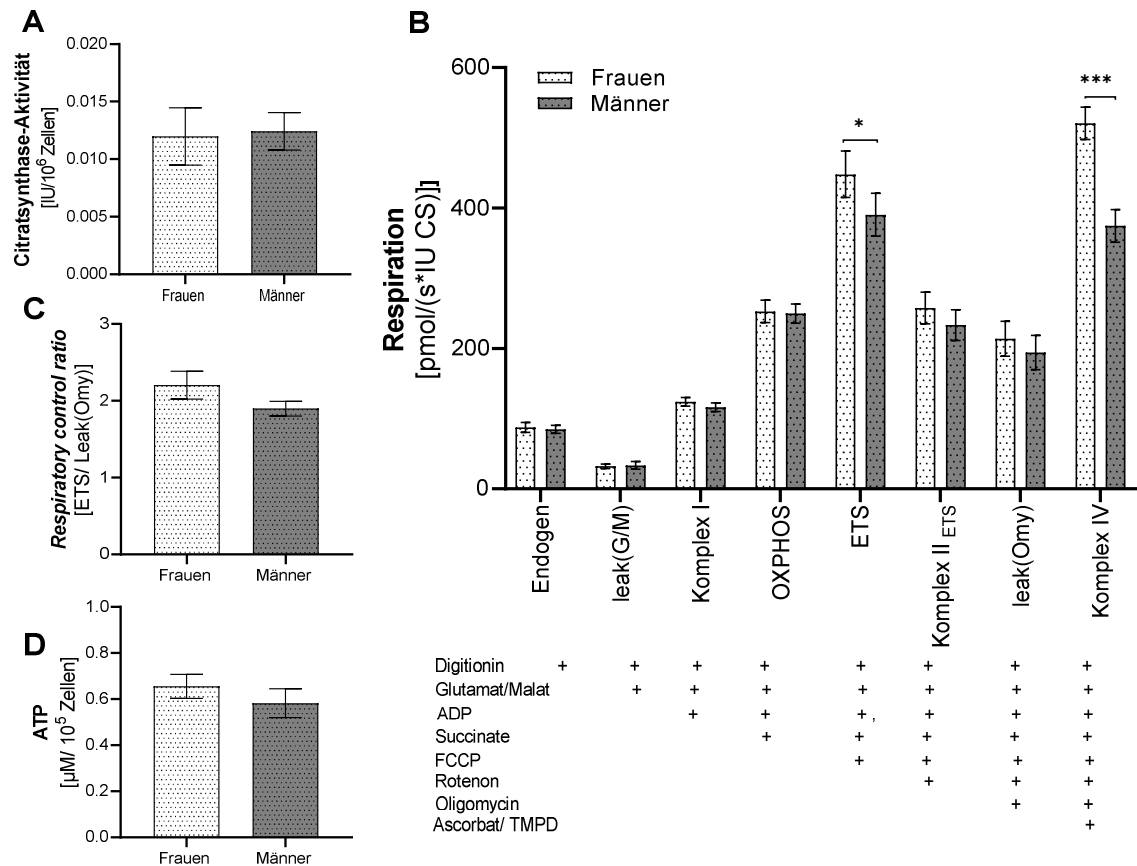


Abbildung 4.24 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs von MCI-Patienten. A Aktivität des mitochondrialen Massemarker Citratsynthase (CS). Die Aktivität der CS unterscheidet sich zwischen den weiblichen und männlichen MCI-Patienten nicht. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=22; ungepaarter t-test. **B Mitochondriale Atmung der isolierten PBMCs von weiblichen und männlichen MCI-Patienten gemessen mit high-resolution Respirometrie.** Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=22; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt; p-Werte sind in Tabelle 4.8 dargestellt (**p<0.01). **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe bei weiblichen und männlichen MCI-Patienten. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=22; ungepaarter t-test. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, n=23, ungepaarter t-test. ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPPOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

Tabelle 4.7 Melatoninstudie – Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.

	Frauen n=10	Männer n=10	p-Wert
O2k-Oxygraph [pmol/ (s*IU CS)]			
Endogene Atmung	106,0±4,77	110,0±2,69	0,46
KI	153,3±7,93	156,4±5,458	0,49
OXPHOS	387,7±18,48	392,1±12,12	0,84
ETS	504,6±23,81	470,2±14,42	0,22
KII _{ETS}	319,6±20,19	273,9±8,78	0,04*
KIV	556,7±36,39	437,5±24,63	0,008**

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; (*p<0.05; ** p<0.01). CS Citratsynthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPHOS Oxidative Phosphorylierung

Tabelle 4.8 MIND AD_{mini}-Studie – Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.

	Frauen n=13	Männer n=9	p-Wert
O2k-Oxygraph [pmol/ (s*IU CS)]			
Endogene Atmung	87,43±7,06	84,73±5,57	0,80
KI	123,8±6,26	116,1±5,98	0,43
OXPHOS	252,5±15,92	249,4±13,62	0,9
ETS	472,3±23,79	390,3±30,48	0,04*
KII _{ETS}	274,4±15,86	233,0±21,94	0,13
KIV	520,6±2,79	374,5±23,20	0,005***

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; (*p<0.05; ** p<0.01). CS Citratsynthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPHOS Oxidative Phosphorylierung

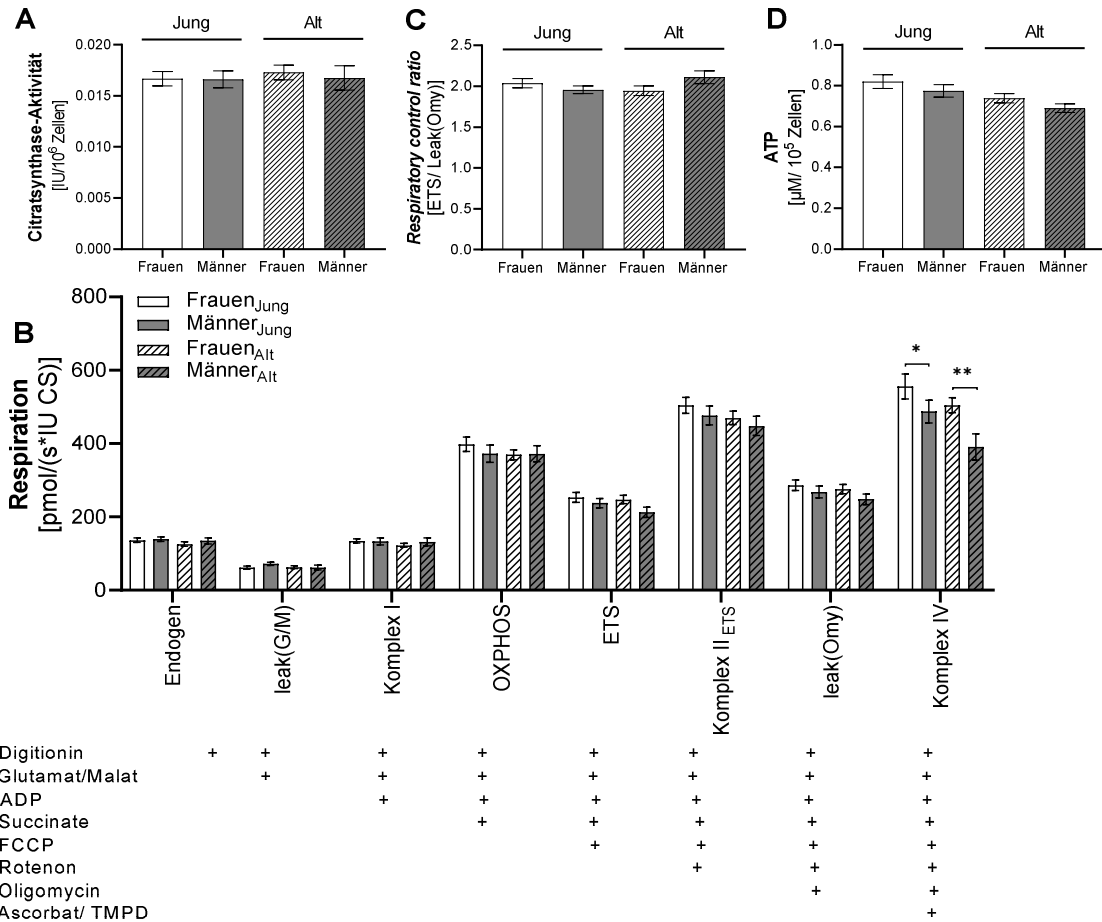


Abbildung 4.25 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs von jungen und alten Probanden. A Aktivität des mitochondrialen Massemarker Citratsynthase (CS). Die Aktivität der CS unterscheidet sich zwischen den jungen Frauen und Männern nicht. Auch zwischen den alten weiblichen und männlichen Probanden kann kein Unterschied detektiert werden. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=115; ungepaarter t-test. **B Mitochondriale Atmung der isolierten PBMCs von weiblichen und männlichen, jungen und alten Probanden gemessen mit high-resolution Respirometrie.** Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=115; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt; p-Werte sind in Tabelle 4.9 dargestellt (*p<0.05). **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe bei weiblichen und männlichen jungen und alten Probanden. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM; n=115; ungepaarter t-test. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level.** Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, n=130, ungepaarter t-test. ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS=Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; M=Malat; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

Tabelle 4.9 PECEMA-Studie – Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.

Probanden	Jung n=57		p-value	Alt n=59		p-value
Gruppe	Frauen n=28	Männer n=29		Frauen n=31	Männer n=28	
O2k-Oxygraph [pmol/(s*IU CS)]						
Endogene Atmung	136,6±6,00	138,8±6,06	0,8	125,8±6,26	134,7±8,08	0,38
KI	134,2±5,85	133,0±9,31	0,91	122,4±5,11	131,7±10,57	0,42
OXPHOS	398,0±19,65	372,3±23,06	0,40	369,3±13,48	372,0±21,46	0,92
ETS	504,1±21,65	476,2±25,82	0,41	469,9±18,29	447,9±26,23	0,49
KIIETS	286,1±14,49	267,5±16,14	0,40	275,5±12,59	248,1±14,58	0,16
KIV	577,0±32,09	487,5±30,98	0,04*	497,8±19,79	390,8±35,69	0,009**

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; (*p<0.05; ** p<0.01). CS Citratsynthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPHOS Oxidative Phosphorylierung.

4.3.2 Zusammenfassung der altersassoziierten Unterschiede der mitochondrialen Funktion in den verschiedenen Studien

Zum Vergleich der mitochondrialen Funktion junger und alter Probanden mit der von MCI-Patienten wurden die Ergebnisse von *Visit 1* der MIND AD_{mini}-Studie und der PECEMA-Studie miteinander verglichen. Beide Studien wurden am gleichen Standort unter den gleichen Bedingungen und unter Verwendung derselben Geräte durchgeführt.

Die Citratsynthase-Aktivität war bei den weiblichen und männlichen MCI-Patienten im Vergleich zu den gleichgeschlechtlichen jungen Probanden signifikant niedriger (Frauen: $p=0,0002$; Männer: $p=0,01$). Im Vergleich zu den gesunden alten Frauen zeigten die weiblichen MCI-Patienten ebenfalls signifikant verminderte CS-Aktivitäten ($p<0,0001$). Die männlichen MCI-Patienten wiesen eine tendenziell niedrigere CS-Aktivität als die gesunden alten Männer auf ($p=0,08$) (siehe **Abbildung 4.26 A**).

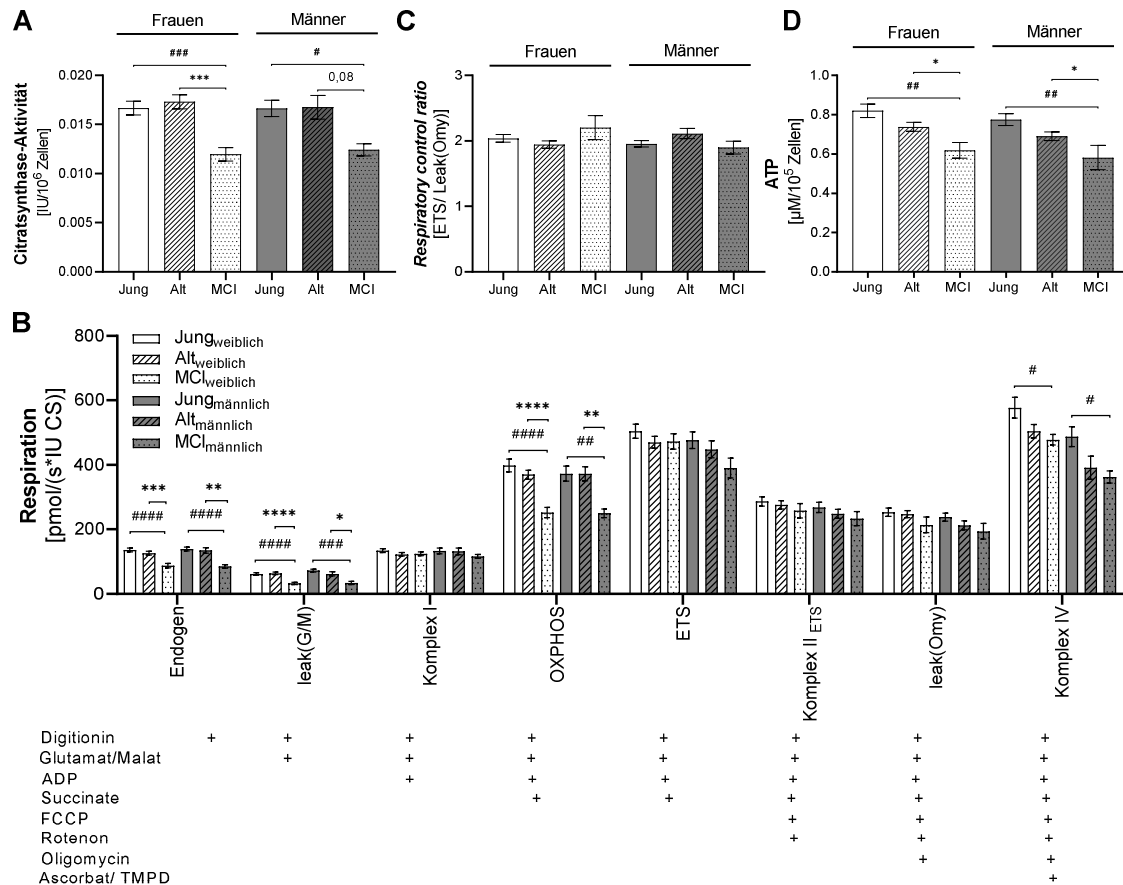


Abbildung 4.26 Vergleich der mitochondrialen Funktion in PBMCs von jungen, alten Probanden und Probanden mit MCI. A Aktivität des mitochondrialen Massemarker Citratsynthase (CS). Die Aktivität der CS unterscheidet sich zwischen den jungen und alten, weiblichen und männlichen Probanden signifikant von der der MCI-Patienten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=22-115$; ungepaarter t-test; p -Werte sind in Tabelle 4.10 dargestellt (*/ $\#p<0.05$; **/ $\#\#p<0.01$; ***/ $\#\#\#p<0.001$; ****/ $\#\#\#\#p<0.0001$). **B Mitochondriale Atmung der isolierten PBMCs von jungen und alten Frauen und Männern und weiblichen und männlichen MCI-Patienten gemessen mit high-resolution Respirometrie.** Die Werte sind normiert auf internationale Einheiten (IU) der Citratsynthase-Aktivität. Die Zugabe der Substrate oder Inhibitoren ist mit einem + gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=22-115$; für jeden Messzeitpunkt wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt; p -Werte sind in Tabelle 4.10 dargestellt (*/ $\#p<0.05$; **/ $\#\#p<0.01$; ***/ $\#\#\#p<0.001$; ****/ $\#\#\#\#p<0.0001$). **C Respiratory control ratio** berechnet aus Atmung des ETS/Leak nach Oligomycin-Zugabe. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $n=22-115$; ungepaarter t-test. **D Zellzahl normalisierte ATP-Level.** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=23-130$, ungepaarter t-test; p -Werte sind in Tabelle 4.10 dargestellt (*/ $\#p<0.05$; **/ $\#\#p<0.01$; ***/ $\#\#\#p<0.001$; ****/ $\#\#\#\#p<0.0001$). ADP=Adenosindiphosphat; CS=Citratsynthase; ETS= Elektronentransportsystem; FCCP=Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon; G=Glutamat; M=Malat; MCI=mild cognitive impairments; Omy=Oligomycin; OXPHOS=oxidative Phosphorylierung; PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen; RCR=Respiratory control ratio; TMPD=Tetramethylphenylendiamin.

Der RCR unterschied sich zwischen den Gruppen nicht (siehe **Abbildung 4.26 C**). Bei der mitochondrialen Respiration zeigten die MCI-Patienten beider Geschlechter zum Teil signifikant niedrigere Werte als die jungen und alten Probanden (siehe **Abbildung 4.26 B** und **Tabelle 4.10**). Die Grundatmung (endogene Atmung) und die oxidative Phosphorylierung

(OXPHOS) waren sowohl bei den Frauen, als auch bei den Männern bei den MCI-Patienten signifikant niedriger als bei den jungen (Endogen: Frauen: $p < 0,0001$; Männer: $p < 0,0001$; OXPHOS: Frauen: $p < 0,0001$; Männer: $p = 0,009$) und gesunden alten Probanden (Endogen: Frauen: $p = 0,0006$; Männer: $p = 0,002$; OXPHOS: Frauen: $p < 0,0001$; Männer: $p = 0,005$). Die Komplex IV Aktivität war bei den MCI-Patienten bei beiden Geschlechtern signifikant niedriger als bei den jungen Probanden (Frauen: $p = 0,04$; Männer: $p = 0,04$). Zwischen den MCI-Patienten und den gesunden alten Probanden unterschied sich die Komplex IV Aktivität nicht. Bei den weiblichen und männlichen MCI-Patienten wurden signifikant niedrigere ATP-Spiegel detektiert als bei den jungen (Frauen: $p = 0,001$; Männer: $p = 0,005$) und gesunden gleichaltrigen Probanden (Frauen: $p = 0,04$; Männer: $p = 0,04$) (siehe **Abbildung 4.26 D**).

Tabelle 4.10 Altersassoziierte Unterschiede in der mitochondriale Komplexaktivität.

	Frauen n=80					Männer n=69				
	Jung n=32	p-Wert	Alt n=34	p-Wert	MCI n=14	Jung n=31	p-Wert	Alt n=29	p-Wert	MCI n=9
CS [IU/10 ⁶ Zellen]	0,017±0,0007	0,0002###	0,017±0,0007	<0,0001****	0,010±0,0007	0,016±0,0008	0,01#	0,017±0,0011	0,08	0,012±0,0006
O2k-Oxygraph [pmol/(s*IU CS)]										
Endogene Atmung	136,6±6,00	<0,0001####	125,8±6,26	0,0006***	87,43±7,06	138,8±6,06	<0,0001####	134,7±8,08	0,002**	84,73±5,57
KI	134,2±5,85	0,28	122,4±5,11	0,87	123,8±6,26	133,0±9,31	0,36	131,7±10,57	0,44	116,1±5,98
OXPHOS	398,0±19,65	<0,0001####	369,3±13,48	<0,0001****	252,5±15,92	372,3±23,06	0,009##	372,0±21,46	0,005**	249,4±13,62
ETS	504,1±21,65	0,38	469,9±18,29	0,94	472,3±23,79	476,2±25,82	0,11	447,9±26,23	0,28	390,3±30,48
KII_{ETS}	286,1±14,49	0,63	275,5±12,59	0,96	274,4±15,86	267,5±16,14	0,30	248,1±14,58	0,62	233,0±21,94
KIV	577,0±32,09	0,04#	497,8±19,79	0,53	520,6±2,79	487,5±30,98	0,04#	390,8±35,69	0,68	374,5±23,20
RCR	2,04±0,05	0,28	1,94±0,06	0,08	2,2±0,18	1,95±0,05	0,58	2,11±0,07	0,20	1,90±0,10
ATP [µM/10 ⁵ Zellen]	0,82±0,03	0,001##	0,74±0,02	0,04*	0,62±0,04	0,78±0,03	0,005##	0,69±0,02	0,04*	0,58±0,06

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test, signifikante Unterschiede sind bei Jung vs. MCI durch ein # markiert und bei Alt vs. MCI durch ein * markiert; (*/#p<0,05; **/##p<0,01; ***/###p<0,001; ****/####p<0,0001). ATP Adenosintriphosphat CS Citratsynthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPHOS Oxidative Phosphorylierung; RCR Respiratory control ratio.

5 Diskussion

5.1 Isolation von PBMCs und anschließende bioenergetische Messungen

5.1.1 Vergleich zweier Zentrifugenröhrchen zur Isolation von PBMCs

Das periphere Blut stellt mit seinen korpuskulären Bestandteilen eine leicht zugängliche Quelle für biologische Materialien wie z.B. Zellen dar, weshalb bioenergetische Analysen in Blutzellen ein guter, minimal invasiver Marker für die mitochondriale Funktion sein können. Da PBMCs einige Gemeinsamkeiten mit Neuronen besitzen (siehe auch **Kapitel 1.3**) und im Gegensatz zu Erythrozyten und Thrombozyten einen Zellkern haben, werden sie im Vergleich zu den anderen Zellen am häufigsten in der Forschung eingesetzt. Deshalb sind Messungen der mitochondrialen Funktion in PBMCs sowohl für die Forschung als auch für die klinische Anwendung eine attraktive Möglichkeit, um mitochondriale Dysfunktionen, die bei verschiedenen Krankheiten auftreten können, zu identifizieren. Allerdings existieren noch keine standardisierten Bedingungen für die Entnahme, den Transport, die Lagerung und die Aufarbeitung der PBMCs, obwohl diese Faktoren einen starken Einfluss auf die Effektivität und Reinheit der Isolation ausüben können.

Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene Versuche durchgeführt, um die in der Literatur teilweise noch offenen Fragen zur Isolationsmethodik und externen Einflüssen zu beantworten. Für reproduktive und verlässliche Ergebnisse wird eine gute Isolationsmethode benötigt, die eine ausreichende Ausbeute an PBMCs garantiert und eine Verunreinigung mit z.B. Thrombozyten verhindert. Die Isolationsmethode kann einen starken Einfluss auf die Anzahl der isolierten Zellen sowie die Populationszusammensetzung der PBMCs haben (Goods *et al.* 2018). Besonders eine Kontamination der PBMC-Fraktion mit Thrombozyten sollte aufgrund der unterschiedlichen energetischen Profile der Zelltypen (siehe **1.3.2.1**) bei Messungen der Bioenergetik vermieden werden. Um das Vollblut in die einzelnen Blutbestandteile aufzuteilen und so die PBMCs gewinnen zu können, wird eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür gibt es spezielle Falcons, die eine poröse Membran beinhalten, die die Auftrennung und Reinheit der Isolate verbessern soll, sowie zu einer Arbeitserleichterung führen. Außerdem scheint diese Methode unabhängiger vom durchführenden Experimentator zu sein. Allerdings sind diese speziellen Zentrifugenröhrchen hochpreisig, weshalb in einer ersten Studie der Nutzen dieser Röhrchen auf die Effektivität und Reinheit der Isolation untersucht werden sollte. Weiterhin sollte analysiert werden, welchen Einfluss die unterschiedlichen Reaktionsgefäße auf die anschließenden Messungen von mitochondrialen Parametern haben.

Die Effektivität der Isolation bei der Gewinnung der Zellen wurde anhand der Zellzahl gemessen. Die Verwendung der Leucosep™ führte zu keiner höheren Zellzahl im Vergleich zu den klassischen Falcons (Falcon: $6,6 \times 10^6 \pm 2,19 \times 10^6$ Zellen/ml; Leucosep™: $7,4 \times 10^6 \pm 2,06 \times 10^6$ Zellen/ml) (siehe **Abbildung 4.1**). Auch auf die Reinheit der Isolation hatten die unterschiedlichen Zentrifugationsröhrchen keinen Einfluss. Beide Reaktionsgefäße führten zu einem Isolat ohne Verunreinigungen mit Granulozyten oder Thrombozyten (siehe **Abbildung 4.2** und **Abbildung 4.3**). Mittels FACS-Analyse wurde untersucht, ob sich die Zentrifugationsröhrchen auf die Zusammensetzung des Isolates ausüben. Es konnten keine Unterschiede in der Zusammensetzung der beiden Isolate beobachtet werden (siehe **Abbildung 4.2** und **Abbildung 4.3**). Bei beiden Ansätzen konnte eine Kontamination mit einer unbekanntem Substanz detektiert werden. Allerdings konnte auch nach mehrfacher Analyse des Biocolls und PBS nicht aufgeklärt werden, um was es sich hierbei handelt. Grievink *et al.* (2016) verglichen ebenfalls den Einfluss verschiedener Isolationslösungen sowie Zentrifugationsröhrchen auf die Zellgewinnung, Viabilität der Zellen und die Populationszusammensetzung (Grievink *et al.* 2016). Unter der Verwendung von Ficoll und einem klassischen Zentrifugationsröhrchen konnte die geringste Zellausbeute erreicht werden (6×10^5 Zellen/ml). Mit Röhrchen, die einen ähnlichen Aufbau wie die hier untersuchten Leucosep™ haben, konnte eine höhere Ausbeute von 8×10^5 Zellen/ml erreicht werden. Die Zusammensetzung der Zellpopulation unterschied sich zwischen den beiden Ansätzen ebenfalls nicht.

Für eine maximale Ausbeute und Reinheit ist es wichtig, die gesamte PBMC-Schicht abzunehmen. Die Abnahme bei den Leucosep™-Tubes ist leichter, da eine Kontamination mit dem Isolationsmedium vermieden wird. Eine Abnahme des Separationsmedium kann zu einer Kontamination der PBMC-Fraktion mit Granulozyten führen bzw. das Risiko dafür erhöhen.

Neben den Effekten auf die Zellausbeute und Reinheit der Isolation wurde in der Studie auch der Einfluss der verschiedenen Zentrifugationsröhrchen auf die ATP-Spiegel und die mitochondriale Atmungsaktivität untersucht. Hier konnte kein Unterschied in der Komplexaktivität detektiert werden (siehe **Abbildung 4.4 A** und **Tabelle 4.1**). Auch die RCR blieb unverändert (siehe **Abbildung 4.4 B**). Die ATP-Spiegel waren bei der Isolation mit den Falcons bei 5×10^5 /ml Zellen 10 % höher und bei 1×10^6 Zellen/ml 5 % höher (siehe **Abbildung 4.4 C**).

Die unterschiedlichen Zentrifugationsröhrchen üben sich damit nicht auf die Messung der mitochondrialen Funktion aus. Hsiao&Hoppel (2018) verglichen in ihrer Studie den Einfluss von unterschiedliche Antikoagulanzen, Isolationsmedien und Puffern auf die Zellgewinnung, Viabilität sowie auf die mitochondriale Atmung (Hsiao & Hoppel 2018). Als Puffer zeigte das PBS im Vergleich zum DPBS und HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) die besten Ergebnisse. Das Ficoll führte im Vergleich zu einem anderen Separationsmedium namens Lymphoprep™

zu einer niedrigeren Ausbeute und Viabilität sowie zu einer geringeren Grundatmung und oxidativen Phosphorylierung. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Eine Analyse der Populationszusammensetzung wäre wichtig gewesen, um die Reinheit des Isolates zu bestätigen. Eine Kontamination mit Thrombozyten kann zu einer höheren mitochondrialen Atmung führen, weshalb die bessere mitochondriale Aktivität nicht unbedingt auf ein besseres Separationsmedium zurückzuführen ist.

Neben den Zentrifugationsröhrchen und dem Separationsmedium kann die Effektivität der Isolation sowie die Messung der mitochondrialen Aktivität auch durch die Lagerdauer- und temperatur beeinflusst werden. Goods *et al.* (2018) konnten in ihrer Studie einen Einfluss der Transporttemperatur auf die Zusammensetzung der Zellpopulation beobachten (Goods *et al.* 2018). Hsiao&Hoppel (2018) konnten ebenfalls einen Einfluss der Lagerdauer auf die Ausbeute sowie Messung der Respiration beobachten. Eine direkte Verarbeitung des Vollblutes innerhalb von einer Stunde führt zur höchsten Ausbeute und besten Respiration (Hsiao & Hoppel 2018). Nach einer 24-stündigen Lagerung sinkt die Ausbeute an Zellen bereits um 13-18%. Die mitochondriale Atmung wird sogar um 30-37% verringert. Nach 48 und 72 h kommt es zu einer signifikanten Abnahme bei allen Parametern. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine schnelle Verarbeitung der Proben essentiell. Wichtig ist aber vor allem, dass der Zeitabstand zwischen der Blutentnahme und Isolation immer der gleiche ist, um eine Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Eine Limitation der Studienergebnisse ist die geringe Anzahl an Probanden. Für die Studie wurden nur zwei Probanden rekrutiert. Allerdings wurden Proben an zehn aufeinanderfolgenden Tagen gewonnen. Die Proben wurden von zwei verschiedenen Experimentatoren bearbeitet, wobei jeder immer Proben aus der Falcon- und Leucosep™ –Gruppe hatte. Grievink *et al.* (2016) haben in ihrer Studie auch den Einfluss unterschiedlicher Experimentatoren untersucht. Die Autoren konnten einen starken Einfluss durch die Experimentatoren feststellen und bis zu 60%ige Unterschiede bei der Zellgewinnung beobachten. Die Ausbeute war aber auch hier bei den Röhrchen mit poröser Membran höher, was für die Verwendung dieser Röhrchen bei wechselnden Experimentatoren spricht.

Die Ergebnisse der Studie deuten an, dass die Leucosep™ zu keiner besseren Ausbeute, Reinheit oder höheren mitochondrialen Aktivität führen. Allerdings ist die Abnahme der PBMCs mit diesen speziellen Zentrifugationsröhrchen einfacher und eine Kontamination mit dem Separationsmedium wird durch die poröse Trennschicht zwischen Medium und PBMCs verhindert. Dies kann gerade bei unerfahrenen Experimentatoren die Reinheit der Probe erhöhen. Durch die Röhrchen können außerdem einheitliche Isolate erreicht werden, wenn verschiedene Experimentatoren die Isolation durchführen. Wie vorher beschrieben, können unterschiedliche Experimentatoren einen starken Einfluss auf die Ausbeute und Zusammensetzung

ausüben. Außerdem ermöglichen die Leucosep™-Tubes eine schnelle Verarbeitung des Vollblutes, was wiederum zu einer verkürzten Lagerzeit führt.

5.1.2 Einfluss von Melatonin auf mitochondriale Parameter

Melatonin agiert neben seiner Funktion als Schlafhormon auch als wichtiges Antioxidanz und beeinflusst dadurch u.a. die mitochondriale Funktion. Bei Humanstudien, die eine Blutabnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfordern und deren Outcome die Messung von oxidativem Stress oder bioenergetischen Parametern ist, kann das im Blut zirkulierende Melatonin zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Die Ergebnisse unserer Studie lassen darauf schließen, dass zwischen physiologischen Konzentrationen des Schlafhormons Melatonin und der mitochondrialen Aktivität in humanen PBMCs ein Zusammenhang bestehen könnte. Bei den männlichen Probanden konnten signifikant höhere Melatoninspiegel am Morgen detektiert werden. Die in den am Morgen entnommenen Proben gemessenen ATP-Spiegel waren ebenfalls im Vergleich zur Probe vom Nachmittag erhöht. Außerdem konnte eine signifikante Steigerung der Komplex IV-Aktivität beobachtet werden.

Diese Ergebnisse werden durch die Erkenntnisse aus der Literatur bestätigt. Die Wirkung von Melatonin auf die mitochondriale Funktion und die antioxidative Kapazität wurde bereits mehrfach nachgewiesen. Allerdings untersuchten die meisten Studien die Wirkung einer Melatonin-Administration in Nagetieren oder in der Zellkultur. Martín *et al.* (2000) detektierten in ihrer Studie mit Wistar-Ratten nach einer Melatoningabe (10 mg/kg i.p.) eine zeitabhängige Erhöhung der Aktivität der mitochondrialen Atmungskomplexe I und IV. Die Melatonin-Verabreichung verhinderte außerdem die durch Rutheniumrot (60 mg/kg i.p.) bedingte Abnahme der Aktivität der Komplexe I und IV (Martín *et al.* 2000).

Zwei Jahre später zeigte die gleiche Gruppe, dass die Inkubation mit Melatonin in nanomolaren Konzentrationen in sub-mitochondrialen Fraktionen aus Rattenhirnen und -leber die Aktivität der Komplexe I und IV dosisabhängig erhöht (Martín *et al.* 2002). Darüber hinaus erhöhte die Inkubation mit Melatonin (100 nM) die Produktion von ATP in aus der Leber isolierten Mitochondrien signifikant.

Areti *et al.* (2017) konnten hingegen keine Effekte der Melatoninbehandlung (28 Tage; 10 mg/kg i.p.) auf die Komplex I, II, III und IV Aktivität und die ATP-Spiegel in isolierten Mitochondrien von männlichen Sprague Dawley Ratten beobachten. In dieser Studie hat Melatonin jedoch die durch Oxaliplatin induzierte mitochondriale Dysfunktion signifikant verbessert (Areti *et al.* 2017).

Zusätzlich zu diesen Auswirkungen auf die Aktivität der Komplexe der Atmungskette und die ATP-Spiegel beeinflusst Melatonin auch andere mitochondriale Funktionen sowie antioxidative Abwehrsysteme.

Patki und Lau (2011) untersuchten die Wirkung einer Melatoningabe auf die phänotypischen, mitochondrialen Einschränkungen in einem Tiermodell der Parkinson Erkrankung. Die Langzeit-Melatoninbehandlung (tägliche Verabreichung über 18 Wochen; 5 mg/kg, i.p.) schützte vor einer mitochondrialen Dysfunktion und dem Verlust von antioxidativen Proteinen (Patki & Lau 2011). Ozturk *et al.* (2000) entdeckten nach siebentägiger Verabreichung von 10mg/kg Melatonin eine erhöhte SOD-Aktivität in der Leber von Ratten (Ozturk *et al.* 2000) und Liu und Ng (2000) konnten diese Steigerung der Aktivität nach einer einzigen Melatonin-Injektion (5mg/kg) in Nieren, Leber und Gehirnen von Ratten bestätigen (Liu & Ng 2000). Darüberhinaus zeigten Antolin *et al.* (1996), dass Melatonin (500 µg/kg) inkrementelle Veränderungen im Expressionsgrad der mRNA für SOD1 und SOD2 in der Harderianischen Drüse von weiblichen Goldhamstern hervorruft (Antolín *et al.* 1996). Die Autoren bestätigten außerdem einen hormonell regulierten Anstieg der Genexpression von antioxidativen Enzymen im Gehirn von Ratten nach Melatonin-Injektion (50 und 500 µg/kg) (Antolín *et al.* 1996; Kotler *et al.* 1998). Mayo *et al.* (2002) detektierten infolge einer Inkubation mit Melatonin erhöhte mRNA-Level von Enzymen der antioxidativen Abwehr in nicht-differenzierten PC12-Zellen und den menschlichen Neuroblastomzellen SK-N-SH (Mayo *et al.* 2002).

Wie bereits erwähnt, wurde der Einfluss von Melatonin auf die mitochondriale Funktion und antioxidative Kapazität meist in Tieren und Zellen untersucht und nicht auf physiologischer Ebene und im Menschen. Der Unterschied zwischen physiologischer und pharmakologischer Wirkungsweise von Melatonin ist nicht immer klar, aber er könnte eher durch die Dosis und nicht durch die Dauer der Hormonwirkung beeinflusst sein. Nach den Erkenntnissen der Literatur hat Melatonin auch auf physiologischer Ebene einen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität. Albarrán *et al.* (2001) untersuchen die physiologische Wirkung von Melatonin auf das antioxidative Enzym SOD in drei verschiedenen Geweben von Küken (Großhirnrinde, Leber und Lunge) (Albarran *et al.* 2001). Der antioxidative Status im Plasma korrelierte mit den physiologischen Melatoninkonzentrationen im Blut. Die Exposition der Küken gegenüber Licht für eine Dauer von sieben Tagen eliminierte den Melatonin-Rhythmus sowie die erhöhte SOD-Aktivität und die antioxidativen Schutzsysteme (Albarran *et al.* 2001). Pablos *et al.* (1998) konnten die gleiche Wirkung auf Glutathionperoxidase (GPx) und Glutathionreduktase (GR) beobachten (Pablos *et al.* 1998). Diese Ergebnisse wurden später von anderen Forschern bei Nagetieren bestätigt (Tomas-Zapico *et al.* 2003; Túnez *et al.* 2003).

Laut Literatur ist die Melatoninfreisetzung bei Frauen im Allgemeinen höher als bei Männern (Santhi *et al.* 2016; Gunn *et al.* 2016). Allerdings konnten in der vorliegenden Studie keine

Unterschiede in der Melatoninkonzentration zwischen Mann und Frau festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte das Schlafverhalten der Teilnehmer sein. Das Schlafverhalten der Teilnehmer wurde mit Hilfe des MCTQ ermittelt. Die durch den MCTQ ermittelten, unterschiedlichen Schlaftypen werden in Chronotypen eingeteilt. Eine Person mit einem niedrigen Chronotyp neigt dazu, früher aufzuwachen und wird als "Lärche" bezeichnet. Personen mit hohen Chronotypen neigen dazu, länger wach zu bleiben und später aufzustehen und werden den sogenannten "Eulen" zugeordnet (Roenneberg *et al.* 2003). Die Auswertung der Fragebögen ergab, dass die meisten weiblichen Probanden einen Chronotyp von 4 aufwiesen, wohingegen bei den männlichen Teilnehmern Chronotypen bis 7 auftraten.

Die Tendenz der weiblichen Probanden zum Frühaufstehen ist mit den, im Vergleich zu den Männern, niedrigeren Melatoninkonzentrationen ($p=0,25$) am Morgen konsistent. Die frühere Aufwachzeit kann mit einer früheren Abnahme der Melatoninspiegel einhergehen.

Dies würde auch erklären, warum bei den weiblichen Probanden keine Unterschiede bei der mitochondrialen Atmung und bei den ATP-Spiegeln zwischen den beiden Zeitpunkten beobachtet werden konnten. Die Melatoninkonzentrationen sind bereits um 8 Uhr morgens niedrig und haben deshalb keinen Einfluss mehr auf die bioenergetischen Messungen. Wie oben bereits beschrieben, nahmen die ATP-Spiegel und die Komplex IV-Aktivität bei den männlichen Probanden am Nachmittag signifikant ab. Diese Abnahme könnte durch die geringeren Melatonin-Blutspiegel zu diesem Zeitpunkt bedingt sein.

Dieser mögliche Effekt von Melatonin auf die mitochondriale Respiration und die ATP-Synthese wird zusätzlich durch die um 8 Uhr fehlenden, signifikanten Geschlechtsunterschiede bestätigt. Wie in **Kapitel 4.2.1** beschrieben, weisen Frauen normalerweise eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität auf und neigen zu höheren ATP-Konzentrationen (siehe **Abbildung 4.10**). In der aktuellen Studie treten diese geschlechtsassoziierten Unterschiede allerdings erst wieder am Nachmittag auf, wenn die Melatoninkonzentrationen im Blut bei den Frauen und Männern nahezu identisch sind (siehe **Abbildung 4.23**).

Melatonin ist ein effektives Antioxidanz, welches bei Erkrankungen, denen oxidativer Stress oder eine mitochondriale Dysfunktion zu Grunde liegt, als effektives Therapeutikum eingesetzt werden könnte. Bei der Erforschung bioenergetischer Parameter darf der Einfluss von Melatonin allerdings nicht vernachlässigt werden. Eine zeitlich einheitliche Blutabnahme oder die Erfassung des Schlafverhaltens oder der Melatoninspiegel sind deshalb für valide und reproduzierbare Ergebnisse essentiell.

5.2 Untersuchung der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn

5.2.1 Korrelation der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn

Viele Studien detektieren Veränderung in, mit der Alterung oder AD assoziierten, Markern in Blutzellen von Alzheimer Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppe im gleichen Alter (Delbarba *et al.* 2016; Feldhaus *et al.* 2011; Cardoso *et al.* 2004; Mancuso *et al.* 2003). Diese Ergebnisse und die in **Kapitel 4.2.2** beschriebenen altersassoziierten Unterschiede deuten auf einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn hin. Auch die in PBMCs und dem Gehirn gleichermaßen auftretenden geschlechtsspezifischen Unterschiede lassen einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Funktion in der Peripherie und dem Gehirn vermuten (siehe **4.2.1**). Allerdings hat keine Studie bisher den direkten Zusammenhang der mitochondrialen Funktion in peripheren Geweben und dem Gehirn verglichen.

Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurden in der PECEME-Studie die in den PBMCs gemessenen ATP-Spiegel und CS-Aktivität mit den im Gehirn bestimmten NAA-Spiegeln korreliert. NAA ist ein Marker der mitochondrialen Funktion und wird in vielen Studien auch als Marker für die neuronale Gesundheit, Lebensfähigkeit und Anzahl an Neuronen beschrieben (Moffett *et al.* 2007). Viele ¹H-MRS-Studien bestätigen eine verminderte NAA-Konzentration bei Demenz und anderen neurologischen Erkrankungen (Ross & Sachdev 2004; Ferguson *et al.* 2002; Clark 1998; Sibbitt *et al.* 1997; Tsai & Coyle 1995). Diese Reduktion kann auf eine reduzierte Anzahl an Neuronen hinweisen, da in diesen hohe Konzentrationen von NAA vorhanden sind (Anglin *et al.* 2012; Manji *et al.* 2012). Außerdem können niedrige NAA-Werte eine mitochondriale Dysfunktion widerspiegeln, da die NAA-Konzentration in Verbindung mit der mitochondrialen Funktion steht (Anglin *et al.* 2012; Manji *et al.* 2012; Signoretti *et al.* 2004; Paslakis *et al.* 2014; Heales *et al.* 1995; Bates *et al.* 1996; Dautry *et al.* 2000; Signoretti *et al.* 2001; Vagnozzi *et al.* 2007).

Die statistische Analyse dieser Korrelation ergab, dass der individuelle Gehalt an NAA in GM und WM nicht mit dem jeweiligen Niveau der ATP-Konzentrationen oder CS-Aktivität in PBMCs korreliert (siehe **Abbildung 4.9** und **Tabelle 4.3**). Da in der **Abbildung 4.9** jedoch eine Tendenz einer positiven Korrelation zu erkennen ist, muss die fehlende Signifikanz nicht unbedingt darauf hindeuten, dass der Energiemetabolismus im Gehirn und in den Blutzellen nicht miteinander verbunden ist. Möglicherweise sind die nicht signifikanten Ergebnisse ein Resultat der zu kleinen Probandenzahl, weshalb dieser Zusammenhang in der PECEMA-Studie erneut in einem größeren Studienkollektiv untersucht wurde (Ergebnisse der Korrelation stehen noch aus und sind nicht Teil dieser Arbeit).

Bartolotti *et al.* (2016) untersuchten in ihrer Studie ebenfalls den Zusammenhang zwischen im Blut und im Hirn gemessenen Markern, die bei der Alterung oder AD verändert sein können (Bartolotti *et al.* 2016). Die CREB-Signalisierung, die u.a. für die Erinnerungsbildung wichtig ist, ist in Mausmodellen von AD dysfunktional. Die Autoren verglichen die CREB-Expression in PBMCs und postmortalem Hirngewebe. Hier konnte eine positive Korrelation zwischen der pCREB Expression in PBMCs und postmortem im präfrontalen Cortex gezeigt werden, die andeutet, dass die Expression in den PBMCs die Expression im Gehirn widerspiegelt. Dies bestätigt die in dieser Arbeit formulierte Hypothese, dass zwischen den Veränderungen im Gehirn und peripheren Geweben, wie PBMCs, während des Alterns und der Pathologie ein Zusammenhang besteht und bestärkt eine weitere Erforschung dieser Thematik. Sollte die Bestätigung der Korrelation gelingen, würde dies in Kombination mit den detektierten altersassoziierten Unterschieden in gesunden alten und junge Probanden die Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs als potentiellen effektiven Biomarker bei der Diagnose von AD weiter bekräftigen.

5.2.2 Geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs und dem Gehirn

Aufgrund der maternalen Vererbung der Mitochondrien scheinen vor allem Frauen im reproduktionsfähigen Alter besser vor oxidativem Stress und Schädigungen der Mitochondrien geschützt zu sein. Viele verschiedene Studien beobachten in den unterschiedlichen Geweben und Organismen eine bessere mitochondriale Funktion, höhere Calciumretentionskapazitäten sowie einen höheren Schutz vor oxidativen Schäden durch eine erhöhte Anzahl an antioxidativen Schutzsystemen (zusammengefasst in (Ventura-Clapier *et al.* 2017)). So zeigen junge Frauen u.a. höhere Spiegel vom wichtigen Antioxidanz Glutathion (GSH) im frontalen und partiellen Cortex (Mandal *et al.* 2012), gesteigerte Aktivität der Citratsynthase sowie der Komplex II-Aktivität in postmortem Hirngewebe (Harish *et al.* 2013).

Die meisten Erkenntnisse basieren allerdings auf Tierstudien oder wurden in humanen, postmortem gewonnenen Hirngeweben oder anderen Geweben durchgeführt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der PECEME-Studie erforscht, ob diese geschlechtsspezifischen Unterschiede in mitochondrialen Parametern auch in frisch isolierten PBMCs beobachtet werden können.

Die Ergebnisse der PECEME-Studie zeigen eine Übereinstimmung mit den Resultaten aus der Literatur. Die Grundatmung, die Aktivität der mitochondrialen Komplexe I und II, OXPHOS und Komplex IV und die entkoppelte Atmung in PBMC, die von jungen Frauen isoliert wurden, waren signifikant höher als bei gleichaltrigen Männern (siehe **Abbildung 4.10 B** und **Tabelle**

4.4). Die Ergebnisse der Messung der mitochondrialen Aktivität im Rahmen der Studie zum Einfluss von Melatonin bestätigen diese Ergebnisse. Auch hier war die Komplex II und IV-Aktivität bei den jungen weiblichen Probanden signifikant höher ($p=0,04$; $p=0,008$) als bei den jungen männlichen Probanden (siehe **Abbildung 4.23 B** und **Tabelle 4.7**). In der PECEMA-Studie konnte ebenfalls eine signifikant höhere Aktivität des Komplexes IV gemessen werden ($p=0,04$). Khalifa *et al.* (2017) haben mit einem O2k-Oxygraphen die geschlechtsspezifischen Unterschiede der mitochondrialen Funktion untersucht. Die Autoren analysierten isolierte Hirnmitochondrien von jungen C57BL6-Mäusen und konnten, im Einklang mit den Ergebnissen aus der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie, eine signifikant höhere oxidative Phosphorylierung und maximale Atmungskapazität sowie Komplex I-Aktivität detektieren (Khalifa *et al.* 2017). Es gibt aber auch eine Studie, die eine höhere Aktivität des Komplex IV im Hippocampus von männlichen Ratten, vor allem im jungen Alter, im Vergleich zu den weiblichen Ratten beobachten konnte (Adzic *et al.* 2017). Allerdings überwiegen die Studien, die eine bessere mitochondriale Funktionalität und geringeren oxidativen Stress bei weiblichen Organismen beobachten (Ruszkiewicz *et al.* 2019; Ventura-Clapier *et al.* 2017).

Die Aktivität der mitochondrialen Atmungskomplexe KI-KIV ist die treibende Kraft für die ATP-Generierung durch den Komplex V der Atmungskette. Daher kann die beobachtete Beeinträchtigung der Komplexaktivitäten die niedrigeren ATP-Werte bei den männlichen Probanden erklären (siehe **Abbildung 4.10 C**). Allerdings waren die ATP-Werte in PBMCs bei der PECEME-Studie zwischen den beiden Geschlechtern nicht signifikant unterschiedlich (siehe **Abbildung 4.10 D**). Im Rahmen der Studie zum Einfluss von Melatonin konnten bei den ATP-Konzentrationen von weiblichen und männlichen Probanden ebenfalls nur tendenzielle Änderungen ($p=0,06$) festgestellt werden (siehe **Abbildung 4.23 D**). Dies trifft auch auf die PECEMA-Studie zu (siehe **Abbildung 4.25 D**). Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu Studien mit Mäusen. Escames *et al.* (2013) beobachten in ihrer Studie mit Mäusen, dass die weiblichen Tiere sowohl eine höhere Aktivität der mitochondrialen Atmung als auch eine höhere ATP-Produktion aufwiesen (Escames *et al.* 2013).

Die CS-Aktivität war bei der PECEME-Studie bei den Frauen signifikant höher als bei Männern ($p=0,04$) (siehe **Abbildung 4.10 A**). Die CS ist ein Enzym des mitochondrialen Citratzyklus, welches stark mit der mitochondrialen Masse korreliert (Larsen *et al.* 2012). Harish *et al.* (2013) detektierten in postmortem humanem Hirngewebe ebenfalls eine höhere CS-Aktivität bei weiblichen Probanden. Dies lässt eine höhere mitochondriale Masse bei Frauen vermuten. Khalifa *et al.* (2017) haben die Anzahl der Hirnmitochondrien von jungen weiblichen und männlichen Mäusen mittels Transmissionselektronenmikroskop bestimmt und konnten bei den weiblichen Tieren eine signifikant höhere mitochondriale Masse feststellen ($p=0,001$) (Khalifa *et al.* 2017). Andererseits konnten diese Unterschiede in der CS-Aktivität in der Melatonin-Studie sowie

auch in der PECEMA-Studie nicht bestätigt werden (siehe **Abbildung 4.23 A** und **Abbildung 4.25 A**). Hier war die CS-Aktivität zwischen den Frauen und Männern gleich. Gagnard *et al.* (2015) entdeckten ebenfalls keinen Unterschied in der CS-Aktivität zwischen männlichen und weiblichen Ratten (Gagnard *et al.* 2015), was wiederum vermuten lässt, dass die bessere mitochondriale Funktion bei Frauen nicht auf einer höheren Anzahl an Mitochondrien beruht, sondern auf einer höheren Komplexaktivität.

Die PECEME-Studie zeigte niedrigere ATP-Werte sowie eine reduzierte mitochondriale Funktion bei PBMCs von Männern, was auf eine allgemein niedrigere mitochondriale Funktion im Vergleich zu Frauen hindeuten kann. Diese niedrigere mitochondriale Funktion könnte die niedrigeren NAA-Konzentrationen im Gehirn der männlichen Probanden bedingen (siehe **Abbildung 4.11**). Mitochondrien sind die Hauptquelle von NAA. Daher kann die signifikant höhere mitochondriale Aktivität zu signifikant höheren NAA-Konzentrationen im weiblichen Gehirn führen. Maudsley *et al.* (2009) fanden ebenfalls signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede in den NAA-Werten in einigen Gehirnregionen von 41 männlichen und 47 weiblichen Teilnehmern (Durchschnittsalter=33 Jahre) (Maudsley *et al.* 2009). Die Geschlechtsunterschiede deuten auf durchschnittlich um 4 % höhere NAA-Konzentrationen in der grauen Substanz (GM) und der weißen Substanz (WM) von Frauen hin.

Aber Geschlechtsunterschiede in der mitochondrialen Funktion können auch in anderen Geweben detektiert werden. Rutkai *et al.* (2015) beobachteten z.B. eine höhere mitochondriale Atmung in frisch entnommenen Hirnarterien von erwachsenen weiblichen Ratten im Vergleich zu männlichen Tieren (Rutkai *et al.* 2015). Khalifa *et al.* (2017) konnten eine höhere mitochondriale Komplexaktivität in Herzmitochondrien von weiblichen Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen männlichen Mäusen beobachten (Khalifa *et al.* 2017).

Genetische Unterschiede bei Frauen und Männern könnten zu den beobachteten Geschlechtsunterschieden im Energiestoffwechsel beitragen. Grundlegende Geschlechtsunterschiede in der mitochondrialen Stoffwechselregulation können durch die mütterliche Vererbung der Mitochondrien entstehen. Mitochondrien von Frauen weisen eine bessere Fähigkeit zur Bewältigung von Stressbedingungen auf und sind relativ widerstandsfähig gegenüber DNA-Schäden und Mutationen, was die Wahrscheinlichkeit reduziert, vererbte Stoffwechselstörungen weiterzugeben (Demarest & McCarthy 2015).

Aber auch Sexualsteroid sind ein weiterer Faktor, der für die beobachteten Geschlechtsunterschiede verantwortlich sein könnte. Der Einfluss von Sexualhormonen würde auch erklären, warum Frauen trotz besserer mitochondrialer Funktion, niedrigerer ROS (Ostan *et al.* 2016) und besserer antioxidativer Kapazität (Viña & Borrás 2010; Mandal *et al.* 2012; Gagnard *et al.* 2015; Demarest & McCarthy 2015; Ostan *et al.* 2016; Austad & Fischer 2016) im reproduktiven Alter nach Eintritt der Menopause eher an Alzheimer erkranken als Männer. Der Rückgang

der weiblichen Sexualhormone nach der Menopause kehrt die Geschlechtsunterschiede um (siehe **1.2.3** und **Abbildung 1.6**). Andere bereits publizierte Studien zeigten eine reduzierte antioxidative Kapazität und erhöhte ROS-Produktion bei Frauen nach der Menopause (Mandal *et al.* 2012; Gaignard *et al.* 2015). Pharmakologische Studien an weiblichen jungen adulten Nagern zeigten, dass Steroide die Gehirnfunktion beeinflussen. Eine Ovariectomie verringerte die mitochondriale oxidative Phosphorylierung im Gehirn und erhöhte den oxidativen Stress (Feng & Zhang 2005; Razmara *et al.* 2007; Irwin *et al.* 2010; Yao *et al.* 2011; Sandhir *et al.* 2014). Gaignard *et al.* (2015) zeigten einen Geschlechtsunterschied in der mitochondrialen Atmung und oxidativen Stress im Gehirn, welcher durch den Alterungsprozess oder eine Ovariectomie unterdrückt wird (Gaignard *et al.* 2015).

Eine direkte genomische Wirkung von Östradiol ist unwahrscheinlich, da weder das antioxidative Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) noch die Glutathionperoxidase (GPx) östrogenempfindliche Elemente in ihrer Promotorregion enthalten. Östradiol kann jedoch die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) aktivieren. MAPK aktiviert den Transkriptionsfaktor NFκB, der die Genexpression von antioxidativen Enzymen hochreguliert (Viña *et al.* 2008). Eine höhere Menge an antioxidativen Enzymen könnte die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe vor Schäden durch ROS schützen und die bessere mitochondriale Respiration bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter erklären. Khalifa *et al.* (2017) konnten eine höhere SOD2-Aktivität in Hirnhomogenaten von weiblichen Mäusen bestätigen (Khalifa *et al.* 2017). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Genexpression von antioxidativen Enzymen konnten in der PECEME-Studie nicht bestätigt werden. Die mRNA-Expression der Gene für die Katalase (CAT) und GPx unterschieden sich zwischen den weiblichen und männlichen Probanden nicht (siehe **Abbildung 4.13** und **Tabelle 4.4**). Die Expression der mRNA für Gene der SOD2 war sogar bei den männlichen Studienteilnehmern signifikant höher als bei den weiblichen. Diese höhere Expression könnte durch einen Kompensationsmechanismus hervorgerufen werden, um möglicherweise vor höherem oxidativem Stress zu schützen. Zudem muss eine erhöhte mRNA-Expression nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Anzahl an antioxidativen Enzymen führen, weshalb hier eine Analyse auf Proteinebene andere Ergebnisse zeigen könnte. Weiterhin kann die bessere mitochondriale Funktion in unserer Studie auch auf andere Faktoren zurückzuführen sein, bei denen eine erhöhte Menge an antioxidativen Enzymen keine Rolle spielt.

Grimm *et al.* (2016) überprüften mehrere Studien, die eine östrogeninduzierte Hochregulierung von Genen zeigten, die für Komponenten der mitochondrialen Elektronentransportkette kodieren, einschließlich KI, KIV und der F1-Untereinheit der ATP-Synthase (Grimm *et al.* 2016b). Dies stimmt mit den in den durchgeführten Studien identifizierten Unterschieden der mitochondrialen Funktion auf zellulärer Ebene überein. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht

auf genetischer Ebene bestätigt werden, denn die relative mRNA-Expression für KI, KIV und KV sowie für die CS war in der PECEME-Studie zwischen beiden Probandenkollektiven gleich (siehe **Abbildung 4.13**). Die Expressionen lagen sogar bei den Männern in der Tendenz etwas höher. Auch die mRNA-Expression der Gene der mitochondrialen Biogenese wie CREB1, SIRT1, TFAM und NRF1 zeigt keine Unterschiede zwischen den Frauen und Männern. Andere Studien konnten eine Hochregulierung der Transkription von mitochondrialen Genen beobachten. Östrogen kann z.B. die Bildung von NRF1 erhöhen, entweder durch eine direkte Aktivierung oder über den Schlüsselregulator PGC1- α (Murphy & Steenbergen 2007; Velarde 2014). Hier könnte eine Western Blot-Analyse ebenfalls zur weiteren Erforschung der Zusammenhänge beitragen.

Zur Bestätigung der Hypothese, dass die mitochondriale Aktivität bei Frauen nach der Menopause auf das Niveau der Männer und noch weiter herabfällt, wurde im Rahmen der PECEMA-Studie auch die mitochondriale Funktion von alten Frauen und Männern miteinander verglichen. In dieser Studie konnten wir zur Literatur gegensätzliche Ergebnisse beobachten. Die gesunden postmenopausalen Frauen wiesen eine signifikant höhere Komplex IV-Aktivität ($p=0,009$) auf als die gleichaltrigen männlichen Probanden (siehe **Abbildung 4.25 B** und **Tabelle 4.9**). Sogar bei den Frauen mit einer MCI-Erkrankung konnte eine signifikant höhere Komplex IV-Aktivität detektiert werden ($p=0,005$) (siehe **Abbildung 4.24 B** und **Tabelle 4.8**). Bei beiden Studien waren die ATP-Spiegel bei den weiblichen Probanden in der Tendenz höher als bei den männlichen Studienteilnehmern (siehe **Abbildung 4.24 D** und **Abbildung 4.25**). Die CS-Aktivität unterschied sich auch hier zwischen den beiden Geschlechtern nicht (siehe **Abbildung 4.24 A** und **Abbildung 4.25 A**). Allerdings nimmt die mitochondriale Aktivität, wie in **Kapitel 4.3.2** beschrieben, bei den weiblichen Probanden im Laufe der Alterung ab. Da dies aber auch bei den Männern zu beobachten ist, scheint die Abnahme der mitochondrialen Funktion eher altersbedingt zu sein und nicht unbedingt durch einen Abfall der weiblichen Geschlechtshormone hervorgerufen zu werden.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Tierstudien erzielt werden. Guevara *et al.* (2011) konnten in ihrer Studie zeigen, dass die CS-Aktivität in alten weiblichen Ratten im Laufe der Alterung signifikant weniger stark abfällt als bei den männlichen Tieren (Guevara *et al.* 2011). Sie konnten ebenfalls signifikant höhere Komplex IV-Aktivitäten bei den weiblichen, alten Ratten beobachten.

Verwunderlich sind vor allem die signifikant höheren Komplexaktivitäten bei den weiblichen MCI-Patienten. Wie unter **Kapitel 1.2.3** beschrieben, haben Frauen in jungen Jahren ein geringeres Risiko für Demenz und anderen Erkrankungen als Männer. Dies scheint sich allerdings im Laufe des Alterungsprozesses in die entgegengesetzte Richtung zu entwickeln, was

an der Abnahme der Östrogenspiegel nach der Menopause liegen könnte. Wie oben beschrieben, scheint das Östrogen die mitochondriale Funktionalität positiv zu beeinflussen. Kommt es zu einem Abfall der Östrogenspiegel während der Menopause, führt dies zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion bis hin zu einer mitochondrialen Dysfunktion (Lejri *et al.* 2018). Eine mitochondriale Dysfunktion spielt wiederum eine Schlüsselrolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD.

So beobachten Studien mit Tiermodellen zur AD signifikant niedrigere antioxidative Schutzsysteme bei weiblichen AD-Mäusen. Schuessel *et al.* (2005) konnten z.B. in einem Mausmodell der AD (Thy1-APP751(SL)) eine frühere Abnahme der SOD1-Aktivität bei den weiblichen Tieren beobachten (Schuessel *et al.* 2005). In einer anderen Studie untersuchten Schuessel *et al.* (2004) die Unterschiede in der SOD1- und GPx-Aktivität in postmortem Hirngewebe von AD-Patienten (Schuessel *et al.* 2004). Sie detektierten signifikant höhere Aktivitäten der beiden antioxidativen Enzyme bei den weiblichen AD-Patienten und begründeten den Anstieg als Reaktion auf erhöhten oxidativen Stress. Ob dies der Fall ist oder ob die weiblichen AD-Patienten eine höhere antioxidative Aktivität aufweisen und damit auch eine bessere mitochondriale Funktion, wie wir es beobachtet haben, müsste weiter erforscht werden. Djordjevic *et al.* (2017) bestätigen unsere Ergebnisse. In ihrer Studie mit einem AD-Mausmodell stellen sie fest, dass männliche TgCRND8-Mäuse eher von mitochondrialen Beeinträchtigungen betroffen sind als weibliche Mäuse (Djordjevic *et al.* 2017). Sie konnten eine höhere basale Atmung und gekoppelte Atmung in isolierten Mitochondrien aus dem Hippocampus von weiblichen Mäusen beobachten. Maynard *et al.* (2015) konnten in den PBMCs von weiblichen Probanden mit einer AD, genau wie in unserer Studie, eine signifikant höhere mitochondriale maximale Atmung sowie eine geringere ROS-Produktion beobachten (Maynard *et al.* 2015).

Zur genaueren Analyse des Einflusses von Geschlechtshormonen wäre eine nachträgliche Bestimmung der Geschlechtshormone sinnvoll. Eine Einnahme von Hormonpräparaten kann die Ergebnisse, vor allem die in der Gruppe mit den alten Frauen, beeinflussen. Studien haben bereits gezeigt, dass die Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion, die im Laufe des Alterungsprozesses und bei AD auftreten, durch eine Östrogengabe wieder verbessert werden können (Borrás *et al.* 2010; Borrás *et al.* 2003; Yao *et al.* 2011). Die Auswertung des Fragebogens zur Erfassung der Medikamenteneinnahme ergab allerdings, dass nur zwei der alten weiblichen Probanden Hormonpräparate eingenommen haben und dies nur sporadisch. Auch die Einnahme von Kontrazeptiva könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse sowie die zyklischen Hormonschwankungen bei den Frauen im reproduktionsfähigen Alter haben. Die Einnahme von Kontrazeptiva wurde ebenfalls erfasst. In der PECEME-Studie gaben vier von 15 Frauen an, Kontrazeptiva einzunehmen, in der PECEMA-Studie 11 von 33. Bei der Melatoninstudie nahmen zwei von zehn weiblichen Teilnehmern Kontrazeptiva ein.

Ob diese geschlechtsassoziierten Unterschiede der mitochondrialen Funktion eine hormonelle, genetische oder epigenetische Ursache haben, muss in weiteren Studien erforscht werden. Neben den biologischen Faktoren könnten auch Umweltfaktoren, wie geschlechtsassoziierte Unterschiede im Lebensstil oder soziokulturelle Einflüsse, eine Rolle spielen.

5.2.3 Altersassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs

Bei der Alterung sowie auch bei der AD scheint eine mitochondriale Dysfunktion eine entscheidende Rolle zu spielen (siehe **1.2.2**). Studien zeigen, dass es im Laufe der Alterung und in der Pathologie der AD und anderen Erkrankungen zu Beeinträchtigungen der Mitochondrien und damit der mitochondrialen Funktion kommt (Rera *et al.* 2012; Boland *et al.* 2013; Anderson & Maes 2014; Ahmad *et al.* 2015).

Eine mitochondriale Dysfunktion kann verschiedene Ursachen haben. Im Laufe des Alterungsprozesses kommt es zu gesteigerten Mutationsraten der mtDNA. Dies wiederum führt zur Bildung von dysfunktionalen Mitochondrien (Lane *et al.* 2015; Wang *et al.* 2019; Zhu *et al.* 2019). Die altersbedingte Abnahme der Mito- und Autophagie führt wiederum zu einer Akkumulation dieser in der Funktion gestörten Mitochondrien (Chistiakov *et al.* 2014; Wang *et al.* 2019). Die dysfunktionalen Mitochondrien weisen eine verringerte mitochondriale Atmungskapazität auf, die Energieproduktion ist vermindert und es kommt zu einer gesteigerten ROS-Produktion, die die mitochondriale Dysfunktion und andere pathologische Prozesse weiter verstärkt. Die mitochondriale Biogenese nimmt ebenfalls ab (Zhu *et al.* 2019) (siehe **Abbildung 1.5**).

Besonders betroffen von den altersbedingten Veränderungen der mitochondrialen Atmungsaktivität sind die Komplexe I und IV. Aber auch die ATP-Synthase (Komplex V) erfährt eine altersbedingte Aktivitätsabnahme (Yin *et al.* 2014). Navarro und Boveris (2004) zeigten in ihrer Studie mit jungen und alten männlichen Wistar-Ratten, dass es bei den Tieren zu einer altersbedingten Abnahme der SOD2 sowie der Aktivität der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette (KI-IV) kommt (Navarro & Boveris 2004). Besonders betroffen von den Effekten der Alterung waren hier auch Komplex I und IV (Boveris & Navarro 2008). Auch die ATP-Synthase war in Hirnmitochondrien von gealterten Tieren leicht erniedrigt (Boveris & Navarro 2008). Diese Ergebnisse konnten auch in Studien mit gealterten Mäusen bestätigt werden. Kurokawa *et al.* (2001) detektierten bei SAMP8 (*senescence-accelerated prone mouse 8*)-Mäusen um 50 % niedrigere SOD2-Spiegel im Vergleich zu SAMR1- (*senescence-accelerated resistant mouse 1*) Mäusen (Kurokawa *et al.* 2001). Xu *et al.* (2007) beobachteten im gleichen Mausstamm eine altersbedingte Abnahme des MMPs und der ATP-Produktion in Plättchen und dem Hippocampus (Xu *et al.* 2007). Shi *et al.* (2010) konnten in den SAMP8-Mäusen

außerdem noch eine mit dem Alter auftretende Reduktion der Komplex IV-Aktivität sowohl in Blutplättchen als auch im Hippocampus beobachten. Die Abnahme der ATP-Spiegel im Laufe des Alterungsprozesses konnten die Autoren ebenfalls bestätigen (Shi *et al.* 2010).

Da laut Literatur Veränderungen des Energiemetabolismus während der Alterung und AD bereits sehr früh auftreten und detektiert werden können (Manczak *et al.* 2004; Mosconi *et al.* 2008), könnte die Detektion der mitochondrialen Funktion im Menschen von großer Bedeutung sein. PBMCs stellen eine vielversprechende Möglichkeit zur Erfassung der mitochondrialen Funktion dar, da sie kostengünstig sind und minimal invasiv gewonnen werden können. Immer mehr Studien bestätigen diesen Ansatz durch die Detektion von altersbedingten peripheren Veränderungen der mitochondrialen Funktion, womit sich die Erforschung der Mitochondrien nicht mehr nur auf das Gehirn beschränkt (Schindowski *et al.* 2003; Migliore *et al.* 2005; Leutz *et al.* 2002; Leuner *et al.* 2007; Leuner *et al.* 2012). Allerdings stellt sich die Frage, ob solche Veränderungen der mitochondrialen Funktion auch in gesunden alten Personen detektiert werden können. Wie oben beschrieben gibt es einige Studien, die altersspezifische Veränderungen in der Komplexaktivität sowie der antioxidativen Enzyme bereits untersucht haben, allerdings sind dies meistens Ergebnisse aus Tierstudien und nur begrenzt auf den Menschen übertragbar. Aus diesem Grund sollte in der PECEMA-Studie untersucht werden, ob bereits bei gesunden alten Probanden Veränderungen in mitochondrialen Parametern in den PBMCs beobachtet werden können.

Bei der Messung der CS-Aktivität konnten zwischen der jungen und der alten Gruppe keine Unterschiede beobachtet werden (siehe **Abbildung 4.14 A**). Vor allem Komplex I und IV sind bei der Alterung von Veränderungen betroffen. Die Komplex IV-Aktivität der alten Probanden war in unserer Studie signifikant niedriger als bei den jungen Studienteilnehmern (Frauen: $p=0,03$; Männer: $p=0,04$) (siehe **Abbildung 4.14 B** und **Tabelle 4.6**). Dies stimmt mit den oben beschriebenen Ergebnissen aus den Tierstudien überein, die bei alten Mäusen ebenfalls eine reduzierte Komplex IV-Aktivität beobachteten (Shi *et al.* 2010; Navarro & Boveris 2004; Yin *et al.* 2014). Ojaimi *et al.* (1999) konnten in Purkinje-Neuronen von alten Probanden eine Beeinträchtigung der Komplex IV-Aktivität im Vergleich zu jungen Probanden beobachten, die schlussendlich zu einer AD führen kann (Ojaimi *et al.* 1999). In postmortem Untersuchungen von verschiedenen Hirnregionen konnten Beeinträchtigungen der KI-Aktivität beobachtet werden sowie eine Abnahme an antioxidativen Enzymen wie der CAT, SOD2 und GSH-Reduktase (Venkateshappa *et al.* 2012).

Auch die ATP-Spiegel unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen signifikant (siehe **Abbildung 4.14 D**). Sowohl die ATP-Spiegel der alten Männer als auch die der älteren Frauen waren signifikant niedriger als bei den jungen, geschlechtsgleichen Probanden (Frauen:

$p=0,04$; Männer: $p=0,03$). Dieser altersbedingte Abfall der ATP-Produktion konnte ebenfalls bereits in Tierstudien bestätigt werden (Shi *et al.* 2010).

Bei der altersbedingten Abnahme der mitochondrialen Funktion können auch die Geschlechtshormone eine entscheidende Rolle einnehmen. Laut Literatur kommt es gerade bei den Frauen in der Postmenopause zu einer Abnahme der mitochondrialen Funktion. Dies ist möglicherweise durch den postmenopausalen Abfall der Östrogenspiegel bedingt. Das Östrogen hat eine positive Wirkung auf die mitochondriale Funktion (siehe **Abbildung 1.7**) und führt zu einer höheren mitochondrialen Aktivität bei jungen Frauen (siehe **5.2.1**). Gegen die Östrogen-theorie spricht, dass es bei den Männern auch zu einer signifikanten Abnahme der Komplex IV-Aktivität und der ATP-Spiegel kommt. Berchtold *et al.* (2008) haben in einer Studie bei 55 kognitiv gesunden Probanden (Alter 20 bis 99 Jahre) eine Genanalyse durchgeführt und konnten altersbedingte Veränderungen im Gehirn von Männern beobachten, die zu einer Herunterregulierung von Genen der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe führen (Berchtold *et al.* 2008). Bei den Männern sinken die Geschlechtshormone zwar auch ab, aber der Abfall ist minimal und sollte die mitochondriale Funktion nicht beeinträchtigen. Trotzdem scheinen die Geschlechtshormone bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion eine entscheidende Rolle zu spielen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Progesteron, Estrogen und Androgenen zu einer effektiven Reduktion der bioenergetischen Beeinträchtigungen in zellulären Modellen der AD beitragen können (Grimm *et al.* 2016a; Lejri *et al.* 2017).

Auf der anderen Seite nehmen mit der Alterung die Mutationen der mtDNA zu. Dadurch, dass diese in unmittelbarer Nähe zur ROS-Produktion ist und nicht wie die nDNA durch Histone geschützt wird, ist die Zunahme an ROS hier besonders verheerend und kann zu mtDNA-Mutationen führen. Die mtDNA codiert für Untereinheiten der Atmungskette, hier auch für Komplex I, III und IV und die ATP-Synthase (Scheffler 2001). Durch oxidativen Stress hervorgerufene Mutationen können zu veränderten Proteinen der Elektronentransportkette führen, die dann dysfunktionale Komplexe mit sich bringen, die wiederum zu einer reduzierten Komplexaktivität führen. Außerdem kann es durch die defekten Proteine zu einer gesteigerten ROS-Produktion durch ein vermehrtes Austreten von Elektronen aus der ETS kommen. Diese führt dann wieder zu einer Schädigung der mtDNA und auch der Komplexe und der Teufelskreis beginnt von vorne. Schlussendlich führt dies zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die langfristig zu einer neuronalen Dysfunktion und dem Absterben von Neuronen führt. Diese Abnahme der Komplexaktivität stimmt mit den Ergebnissen unserer Studie überein. Die altersbedingte Abnahme der Komplexaktivität sowie der ATP-Produktion (möglicherweise bedingt durch eine dysfunktionale ATP-Synthase) können durch die beschriebenen Mechanismen hervorgerufen werden.

Eine mitochondriale Dysfunktion spielt wie bereits erwähnt auch bei der Entstehung der AD eine entscheidende Rolle (siehe **1.2.2**). Ähnlich wie bei der Alterung kommt es auch bei der AD zu Veränderung der Komplex IV-Aktivität, aber auch bei den anderen Komplexen der mitochondrialen Atmungskette. (Cottrell *et al.* 2001; Bubber *et al.* 2005). Auch hier kann dieser Defekt der Komplexe durch mtDNA-Schädigungen, die durch erhöhten oxidativen Stress hervorgerufen wurden, bedingt sein. Durch eine Störung der Mitophagie kommt es zu einer veränderten Morphologie der Mitochondrien und zur Akkumulation dysfunktionaler Proteine. Bei der AD-Erkrankung wird die mitochondriale Funktion noch zusätzlich durch die A β - und Tau-pathologie beeinflusst. Eine mitochondriale Dysfunktion kann die A β - und Tau-Aggregation begünstigen, aber A β und Tau scheinen auch direkt zu einer Abnahme der Komplex I und IV-Aktivität zu führen, sowie zu einer Reduktion des MMPs und der ATP-Produktion (Keil *et al.* 2004; Crouch *et al.* 2005; Rhein *et al.* 2009; Rhein *et al.* 2010; Grimm *et al.* 2016b). Außerdem führt die A β -Akkumulation zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses, der dann wiederum zu einer Schädigung der mtDNA und Komplexe führen kann (Eckert *et al.* 2012).

Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie, die die mitochondriale Funktion in PBMCs von gesunden jungen und alten Probanden untersucht. Die bereits vorhandenen Studien, die die mitochondriale Funktion in Blutzellen und PBMCs erforschen, untersuchten diese meistens in AD-Patienten und nicht bei gesunden alten Probanden.

In Blutplättchen von AD-Patienten kann eine mitochondriale Dysfunktion mit erhöhter ROS-Produktion und gesteigertem oxidativen Stress beobachtet werden (Delbarba *et al.* 2016). In verschiedenen Studien detektierten die Autoren eine signifikante Abnahme der Komplex IV-Aktivität in Plättchen von AD-Patienten (Valla *et al.* 2006; Cardoso *et al.* 2004; Mancuso *et al.* 2003). In Einklang mit diesen Ergebnissen und den in der Literatur beschriebenen durch AD hervorgerufenen Veränderungen, kommt es bei an AD-Erkrankten zu verringerten ATP-Spiegeln und erhöhten ROS-Konzentrationen (Cardoso *et al.* 2004). In Plättchen von alten Probanden und AD-Patienten konnte zudem ein reduziertes Membranpotential detektiert werden (Shi *et al.* 2008).

Allerdings handelt es sich hier um Studien mit Blutplättchen und nicht mit PBMCs. Die Studienlage zur mitochondrialen Funktion in Lymphozyten, einer Fraktion der PBMCs, bei sporadischen AD-Patienten ist gering. Dabei sind PBMCs besonders gut für die Erforschung von neuronalen Veränderungen geeignet (siehe **1.3.1**). Feldhaus *et al.* (2011) konnten in isolierten Lymphozyten von AD-Patienten eine signifikant niedrigere Komplex II- und IV-Aktivität detektieren (Feldhaus *et al.* 2011). Delbarba *et al.* (2016) untersuchten in ihrer Studie die mitochondriale Funktion in Lymphozyten von AD-, MCI-Patienten und gesunden gleichaltrigen Kontrollpersonen (Delbarba *et al.* 2016). Die Komplex IV-Aktivität sowie die CS-Aktivität waren hier bei den MCI-Patienten signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Allerdings konnte dieser

Unterschied nach der Normierung der Komplexaktivität auf die CS nicht mehr beobachtet werden. Auch die AD-Gruppe zeigte im Vergleich zu Kontrollgruppe einen leichten, aber signifikanten Anstieg der Komplex IV Aktivität. Auch nach der Normierung war dieser Unterschied noch zu sehen. Weiterhin untersuchten die Autoren die SOD2-Aktivität und konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Ein Hinweis auf eine geringere mitochondriale Masse könnte die niedrigere mtDNA Menge in den AD- und MCI-Patienten sein. Die zwei Regulatoren der mitochondrialen Biogenese, TFAM und PGC-1 α , waren bei den AD-Patienten signifikant erniedrigt, bei den MCI-Patienten zeigte sich nur eine Reduktion in der TFAM Proteinexpression.

Leuner *et al.* (2012) konnten bei der Untersuchung der Lymphozyten von AD-Patienten eine signifikante Reduktion der MMP-Spiegel beobachten. Diese Reduktion konnte auch bei MCI Patienten gemessen werden. Die untersuchten Gruppen bestehen sowohl aus weiblichen als auch aus männlichen Probanden. Weiterhin untersuchten die Autoren die Aktivität der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe sowie des Komplex V in Lymphozyten von sechs weiblichen AD-Patienten und verglichen diese mit der von sechs gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Kontrollen. Die Lymphozyten der AD-Patienten zeigten eine signifikant niedrigere endogene Atmung, sowie eine geringere OXPHOS-Aktivität. Weiterhin war die RCR bei der AD-Gruppe signifikant niedriger, wohingegen die mitochondriale Masse sich nicht unterschied.

Zur weiteren Untersuchung der Veränderungen der mitochondrialen Funktion bei MCI-Patienten wurden im Rahmen dieser Arbeit die Ergebnisse der basalen Messungen der mitochondrialen Funktion in PBMCs bei den MCI-Patienten aus der MIND AD-Studie mit den geschlechtsgleichen jungen und alten Probanden aus der PECEMA-Studie verglichen.

Die in den PBMCs von MCI-Patienten gemessene CS-Aktivität war sowohl im Vergleich zu den jungen Probanden (Frauen: $p=0,0002$; Männer: $p=0,01$) als auch zu den alten weiblichen Probanden signifikant niedriger (Frauen: $p<0,0001$) (siehe **Abbildung 4.26 A** und **Tabelle 4.8**). Der Unterschied zwischen der CS-Aktivität der männlichen MCI-Patienten und gesunden alten Männern war nicht signifikant ($p=0,08$). Die geringere CS-Aktivität der MCI-Patienten könnte ein Indikator für eine niedrigere mitochondriale Masse bei MCI-Erkrankten sein. Dies können die Ergebnisse von Delbarba *et al.* (2016) bestätigen (Delbarba *et al.* 2016). Die Autoren bestimmten als Marker der mitochondrialen Masse die Menge an mtDNA. Diese war, wie in der hier vorliegenden Arbeit, bei den MCI- und AD-Patienten signifikant verringert. Andere Studien mit AD-Patienten konnten hingegen keine Veränderungen bei Markern der mitochondrialen Masse beobachten (Leuner *et al.* 2012). Bei der Bestimmung der CS detektierten Delbarba *et al.* (2016) allerdings signifikant höhere Aktivitäten bei den MCI- und AD-Patienten.

Auch die mitochondriale Komplexaktivität war bei den MCI-Patienten im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen zum Teil signifikant verringert. Bei den MCI-Patienten konnte im Vergleich zu der jungen und alten Studienpopulation eine signifikant niedrigere Grundatmung (endogene Atmung) und eine verringerte OXPHOS-Aktivität detektiert werden (siehe **Abbildung 4.26 B** und **Tabelle 4.10**). Leuner *et al.* (2012) beobachteten ebenfalls eine Abnahme der Aktivität in diesen Stadien der mitochondrialen Atmung, allerdings bei Patienten, bei denen bereits eine AD diagnostiziert wurde (Leuner *et al.* 2012). In dieser Studie war auch die RCR der AD-Patienten signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe. In der vorliegenden Analyse konnten keine Unterschiede im RCR zwischen den MCI-Patienten und den jungen und alten Probanden gemessen werden (siehe **Abbildung 4.26 C** und **Tabelle 4.10**). Maynard *et al.* (2015) detektierten in den PBMCs von AD Patienten auch ein Defizit der endogenen Atmung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maynard *et al.* 2015). Die Aktivität des Komplex IV unterschied sich nur zwischen den MCI-Patienten und der jungen Gruppe signifikant (Frauen: $p=0,04$; Männer: $p=0,04$) (siehe **Abbildung 4.26 B**). Zwischen der MCI-Gruppe und den alten gesunden Probanden konnte kein Unterschied beobachtet werden. Zwei Studien, die die mitochondriale Funktion in Lymphozyten untersuchten, konnten ebenfalls keine Veränderungen der Komplexaktivitäten bei AD im Vergleich zu den gesunden Kontrollen beobachten (Molina *et al.* 1997; Casademont *et al.* 2003). Andererseits zeigen andere Studien signifikant niedrigere Komplex IV-Aktivitäten bei AD-Patienten (Feldhaus *et al.* 2011). Allerdings wurden diese in Lymphozyten von AD-Patienten gemessen, bei denen eine mitochondriale Dysfunktion möglicherweise schon stärker ausgeprägt ist als bei den in der MIND AD_{mini}- Studie untersuchten MCI-Patienten. Delbarba *et al.* (2016) beobachteten bei den MCI-Patienten sogar höhere Komplex IV-Aktivitäten, die allerdings nach der Normierung auf die Citratsynthase (wie es bei unseren Ergebnissen auch der Fall ist) nicht mehr vorhanden waren. Bei den AD-Patienten konnten sie auch nach der Normierung noch höhere Komplex IV-Aktivitäten beobachten (Delbarba *et al.* 2016). Dieser Anstieg der Komplex IV-Aktivität steht allerdings im Widerspruch zu zahlreichen Ergebnissen aus Tier- und Humanstudien, die eine starke Beeinträchtigung des Komplexes IV bei AD beobachten können (Lane *et al.* 2015).

Trotz der fehlenden Unterschiede beim Komplex IV wiesen die alten Probanden signifikant höhere ATP-Spiegel auf als die MCI-Patienten (Frauen: $p=0,04$; Männer: $p=0,04$). Auch die ATP-Spiegel der jungen Probanden waren signifikant höher (Frauen: $p=0,001$; Männer: $p=0,005$).

Unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Studien können einerseits durch verschiedene Messmethoden bedingt sein. Manche Autoren haben die Komplexaktivität mittels Enzymassays bestimmt, wohingegen andere mithilfe eines speziellen Gerätes (Oxygraph) die mitochondriale Aktivität über den bioenergetischen Flux ermittelt haben. Andererseits kann

auch der unterschiedliche Schweregrad der MCI oder AD die Unterschiede zwischen den Studien erklären. Eine Limitation unseres Forschungsansatzes ist die geringe Probandenanzahl bei der Studie mit den MCI-Patienten. Außerdem wurde in der Studie keine Klassifizierung des Schweregrades der MCI-Erkrankung durchgeführt, wodurch möglicherweise eine sehr heterogene Gruppe untersucht wurde.

Die Ergebnisse aus der PECEMA-Studie sowie dem Vergleich mit den MCI-Patienten liefern vielversprechende Erkenntnisse. Die PBMCs sind eine geeignete Methode zur Detektion von Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion. Da sich Veränderungen der mitochondrialen Funktion bereits bei gesunden alten Probanden nachweisen lassen, scheint die Methode sensitiv genug zu sein und könnte für eine frühzeitige Diagnose von ersten Anzeichen einer AD genutzt werden. Denn auch bei den Probanden mit den milden kognitiven Beeinträchtigungen kann nochmal eine Verschlechterung der mitochondrialen Funktion im Vergleich zu den gesunden alten Probanden beobachtet werden. Außerdem könnte die Methode genutzt werden, um den Erfolg von Präventions- und Therapiestrategien mit dem Ziel der mitochondrialen Funktion kostengünstig und mit einer geringen Belastung für die Probanden zu überwachen (siehe 4.2.3).

5.3 Einfluss einer sechsmonatigen multimodalen Intervention auf metabolische Parameter und die mitochondriale Funktion in PBMCs

Multimodale Interventionen, bestehend aus Ernährungs-, Bewegungs- und kognitiven Modulen, könnten aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie der AD effektiv zur Prävention und Therapie von AD und Demenz beitragen. Aber auch die einzelnen Komponenten der Studie, wie z.B. eine mediterrane Ernährung, Omega-3-Fettsäuren Supplementationen oder körperliches und kognitives Training, zeigen laut Literatur vielversprechende Effekte im Zusammenhang mit MCI und AD. Eine starke Orientierung der Ernährung an den Prinzipien der mediterranen Diät (siehe 1.4.1) wird mit einer geringeren Mortalität und einem reduzierten Risiko für kardiovaskuläre und neuroplastische Erkrankungen assoziiert (Kastorini *et al.* 2011; Sofi *et al.* 2014). Auch bei der Demenz und AD scheint die Ernährungsweise einen risikoreduzierenden Effekt aufzuweisen (Scarmeas *et al.* 2006; Gardener *et al.* 2012; Tsivgoulis *et al.* 2013; Sofi *et al.* 2014; Singh *et al.* 2014; Wu & Sun 2017). Ein wichtiger Bestandteil der mediterranen Ernährung ist u.a. eine hohe Aufnahme an mehrfach ungesättigten FS. Eine erhöhte Aufnahme an Omega-3-FS, vor allem EPA und DHA, ist mit einer gesundheitsfördernden Wirkung bei der Reduzierung des Risikos für AD assoziiert (Barberger-Gateau *et al.* 2002; Morris *et al.* 2003). Ein körperlich aktiver Lebensstil scheint ebenfalls mit der Hirngesundheit assoziiert zu

sein. Körperlich aktive Menschen entwickeln im Vergleich zu inaktiven Personen weniger kognitive Beeinträchtigungen und erkranken seltener an Demenz und AD (Hamer & Chida 2009; Sofi *et al.* 2011; Stephen *et al.* 2017; Gallaway *et al.* 2017). Kognitives Training kann zu einer Verbesserung der kognitiven Leistung führen und damit ebenfalls das Risiko für kognitive Beeinträchtigungen verringern (Borella *et al.* 2010; Rebok *et al.* 2014; Anguera *et al.* 2013) (siehe **1.4.4**).

In der MIND AD_{mini}-Studie wurde in einer sechsmonatigen Interventionsstudie der Einfluss einer multimodalen Intervention auf die kognitive Funktion, die körperliche Fitness, vaskuläre und metabolische Parameter und die mitochondriale Funktion in PBMCs von 24 MCI-Patienten untersucht. Teil der multimodalen Intervention waren regelmäßige Ernährungsberatungen, zweimal wöchentliches Ausdauer- und Kraft-Training unter Anleitung von Fachpersonal, kognitives Training sowie in einer Gruppe (L&F-Gruppe), die tägliche Einnahme eines mit Omega-3-FS angereicherten Drinks. Dieser spezielle Drink auf Milchbasis enthält neben den mehrfach ungesättigten Omega-3-FS EPA und DHA noch B-, C- und E-Vitamine, Uridin, Selen und Cholin und konnte schon in mehreren Studien mit positiven Effekten auf MCI und AD assoziiert werden (Rijpmma *et al.* 2017; Scheltens *et al.* 2010; Scheltens *et al.* 2012). Die Ergebnisse der kognitiven Analysen und der körperlichen Fitness sind nicht Teil dieser Arbeit.

5.3.1 Einfluss der Intervention auf anthropometrische und metabolische Parameter

Zur Erforschung der Effekte der multimodalen Intervention und deren einzelner Bestandteile wurden anthropometrische Parameter wie Körpergewicht und der WHR erfasst. Zusätzlich wurde der Effekt auf metabolische Parameter wie das Lipoproteinprofil und der Entzündungsmarker Interleukin-6 im Blut analysiert.

Ein hohes Körpergewicht in Kombination mit einer adipogenen Fettverteilung sowie eine Dyslipidämie können zu metabolischen oder kardiovaskulären Erkrankungen beitragen, die wiederum das Risiko für die Entstehung einer MCI oder AD erhöhen (Coutinho *et al.* 2011; van Charante *et al.* 2016). Als Entzündungsmarker wurde das Cytokin Interleukin-6 (IL-6) bestimmt. IL-6 ist ein klassisches pro-inflammatorisches Cytokin, welches von einer Vielzahl an Zellen produziert wird. Es reguliert mehrere physiologische Prozesse wie die akute Phase-Antwort, Inflammation, Immunantwort, Hämatopoese und Zellwachstum. Abnormal hohe IL-6 Spiegel führen zu einer unkontrollierten, inflammatorischen Reaktion sowie zu einer chronischen Inflammation. Aus diesem Grund trägt IL-6 maßgeblich zu Autoimmun- und chronisch-entzündlichen Erkrankungen bei (Ataie-Kachoe *et al.* 2014) und spielt auch eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen, die wie oben erwähnt das Risiko für eine Demenz erhöhen

können. Außerdem deuten immer mehr Studien an, dass IL-6, neben Interleukin-1 β (IL-1 β) und dem Tumornekrosefaktor α (TNF- α), zum Tod von Neuronen und einer neuronalen Dysfunktion im Gehirn führen kann (Rosenberg 2005). Einige Studien konnten bei MCI und AD-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontroll-Gruppe erhöhte Serum und Plasma IL-6 Spiegel feststellen (Kim *et al.* 2017; Teunissen *et al.* 2002; Licastro *et al.* 2000).

Das Körpergewicht der Interventionsgruppen wurde in den sechs Monaten viermal erfasst, um einen Einfluss der Lebensstiländerung auf das Gewicht und den Taillen-Hüftumfang zu beobachten. In der Lifestyle-Gruppe kam es zu keiner Gewichtsveränderung durch die Intervention (siehe **Abbildung 4.15 A** und **B**). Bei der *L&F*-Gruppe führt die sechsmonatige Intervention zu einem tendenziell höheren Körpergewicht (Frauen: $p=0,09$; Männer: $p=0,05$). Dieser Gewichtsanstieg kann durch eine Zunahme an Fett, aber auch durch die während der Intervention höhere körperliche Aktivität auf eine Zunahme der Muskelmasse zurückzuführen sein. Hier wäre eine Bioimpedanz-Analyse sinnvoll gewesen, um herauszufinden, inwiefern sich die Körperzusammensetzung der Probanden verändert hat. Eine Zunahme der Muskelmasse müsste sich allerdings auch bei der *Ls*-Gruppe durch eine Gewichtszunahme zeigen, da die Art und die Intensität der körperlichen Aktivität in beiden Gruppen gleich waren. Eine weitere Ursache für die leichte Gewichtszunahme in der *L&F*-Gruppe könnte der mit Omega-3-FS angereicherte Drink sein. Bei dem Drink handelt es sich um ein Getränk auf Milchbasis. Die Probanden der *L&F*-Gruppe mussten täglich eine Flasche à 125 ml (125kcal, genaue Zusammensetzung siehe Anhang) verzehren. Das heißt, wenn die Probanden ihre Ernährung nicht an die zusätzliche Kalorienaufnahme angepasst haben, kann es sein, dass die Probanden täglich 125 kcal mehr aufgenommen haben als gewöhnlich, was die leichte Gewichtszunahme erklären würde. Ein isokalorisches Placebo-Getränk wird für zukünftige Studien in Erwägung gezogen, um klare Daten bezüglich der Gewichtszunahme zu erhalten.

Der Waist-Hip-Ratio, das Verhältnis von Taillen zu Hüftumfang, hat sich nicht verändert (siehe **Abbildung 4.15 C** und **D**), lag allerdings bei allen Gruppen schon beim *Visit 1* über dem Normalwert (siehe **Tabelle 3.7** und **Tabelle A1**). Ein zu hoher WHR, definiert als $\geq 0,84$ für Frauen und $\geq 0,90$ für Männer, kann mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen des Stoffwechsel und des Herz-Kreislaufsystems sowie einer gesteigerten Mortalität einhergehen (Coutinho *et al.* 2011; World Health Organization 2011; DAG - Deutsche Adipositas Gesellschaft 2014).

Zur weiteren Erforschung des Einflusses der Intervention wurden die Cholesterin-, HDL-, LDL-, Triglycerid- und Interleukin-6- Werte im Blut der Probanden beim *Visit 1* und *Visit 2* bestimmt (siehe **Abbildung 4.16** und **Tabelle A1**). In der *Ko*-Gruppe kam es zu einer leichten Zunahme der Cholesterinspiegel ($p=0,06$), wohingegen es in der *Ls*-Gruppe zu keinen Veränderungen kam. Die *L&F*-Gruppe wies beim *Visit 2* signifikant höhere Cholesterinwerte auf. Eine Cholesterinzunahme ist nicht immer nur negativ zu betrachten, da es darauf ankommt, welche Form

des Cholesterins zunimmt. Das HDL-Cholesterin transportiert peripheres, subendotheliales Cholesterin in die Leber, wo es abgebaut wird (Karr 2017). Das LDL transportiert das Cholesterin von der Leber in die verschiedenen Gewebe und führt zur Bildung von Plaques, die mit einem erhöhten Risiko für atherosklerotische Herzerkrankungen assoziiert sind. Eine Imbalance zwischen LDL und HDL kann das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie einen Herzinfarkt oder Schlaganfall, erhöhen (Karr 2017). Bei der Ko- und Ls-Gruppe zeigten sich keine Veränderungen beim LDL und HDL vom *Visit 1* zum *Visit 2*. Bei der L&F-Gruppe stieg das HDL-Cholesterin signifikant ($p=0,02$; *Visit 1*: $62\pm 8,7$; *Visit 2*: $71\pm 11,31$ mg/dl) an, das LDL erhöhte sich nur leicht ($p=0,08$; *Visit 1*: $131,5\pm 17,7$; *Visit 2*: $138,3\pm 16,46$ mg/dl). HDL-Spiegel von ≥ 60 mg/dl können das Risiko für atherosklerotische, kardiovaskuläre Erkrankungen verringern. Diese Erhöhung des LDL und HDL-Cholesterins kann durch die langkettigen Fettsäuren EPA und DHA hervorgerufen werden. Diese sind in dem Omega-3-Drink enthalten, den die L&F-Gruppe täglich verzehrte. Xyda *et al.* (2019) konnten ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Gesamt – und HDL- Cholesterins in gesunden älteren Probanden nach einer Omega-3-FS-Supplementation beobachten (Xyda *et al.* 2019). In Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen der L&F-Gruppe kam es auch dort zu keinen signifikanten Effekten auf das LDL-Cholesterin. Thomas *et al.* (2004) untersuchten in ihrer Studie den Effekt einer Omega-3-FS-Supplementation oder körperlicher Aktivität sowie der Kombination der beiden Interventionen auf die Lipoproteine im Blut von jungen Probanden. Die Omega-3-FS Supplementation führte zu einem Anstieg des HDLs, die körperliche Aktivität zu einer Steigerung von HDL und LDL. Die Kombination führte wie auch in unserer Studie zu einem Anstieg von HDL und LDL (Thomas *et al.* 2004). Den Effekt der körperlichen Aktivität konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen. Wie oben bereits erwähnt, zeigte die Ls-Gruppe keine Veränderungen in der Lipoprotein-Zusammensetzung im Blut. Allerdings gibt es auch Studien, die keinen Effekt (Padro *et al.* 2015; Mori *et al.* 2000; Sanchez-Muniz *et al.* 1999) oder einen senkenden Effekt der Omega-3-FS auf das HDL-Cholesterin (Phillipson *et al.* 1985) beobachten können.

In keiner der drei Gruppen hatte die Intervention einen Einfluss auf den Triglyceridwert im Blut. In der Literatur werden langkettige Fettsäuren wie EPA und DHA allerdings mit einer Abnahme der Triglyceridspiegel assoziiert (Bucher *et al.* 2002; Harris *et al.* 1997).

Der IL-6 Wert war in der Ls-Gruppe beim *Visit 2* leicht erhöht. Bei den anderen Gruppen blieb das Interleukin-6 unverändert. Eine mögliche Erklärung für die erhöhten IL-6 Werte bei der Ls-Gruppe könnte der in anderen Studien beschriebene steigernde Einfluss durch körperliche Aktivität sein. Während akuter Aktivität kommt es zu einer Freisetzung von IL-6 aus den Muskeln ins Blut (Pedersen 2017). Dieser Effekt konnte aber auch in Studien mit einer Bewegungsintervention über zwölf Wochen beobachtet werden (Lavebratt *et al.* 2017). Auf der anderen Seite gibt es auch Studien, die keinen Effekt auf die IL-6 Spiegel durch körperliche Aktivität

beobachten (Tunc-Ata *et al.* 2017) oder sogar einen Abfall der IL-6-Spiegel (Schumacher *et al.* 2006; Goldhammer *et al.* 2005; Cesari *et al.* 2009). Dies wird wiederum als positiv beschrieben, da ein niedrigerer IL-6-Spiegel zur Abnahme von pro-inflammatorischen Cytokinen führt (Petersen & Pedersen 2005). IL-6 bewirkt im Muskel eine Muskelhypertrophie und wirkt sich auf die Glucoseaufnahme, den Glykogenabbau und die Lipolyse aus. In anderen Organen beeinflusst es u.a. die Lipolyse und FS-Oxidation und trägt damit zur Energiebereitstellung während der körperlichen Aktivität bei (Huh 2018). Ob dieser Anstieg in der *Ls*-Gruppe chronisch oder kurzfristig erhöht war, kann nicht geklärt werden. Denn langanhaltende IL-6 Werte können zu einem katabolischen Effekt sowie zur Muskelatrophie führen, was dann wiederum zu einer Reduktion der Muskelstärke, zu starkem Muskelkater und einer beeinträchtigten Muskelfunktion führt (Clarkson & Hubal 2002). Dies wäre gerade bei älteren Probanden problematisch, da die Reduktion der Muskelstärke und muskuläre Dysfunktion das Sturzrisiko erhöhen könnten. Dieser möglicherweise Aktivitätsbedingte Anstieg der IL-6 Spiegel tritt in der *L&F*-Gruppe allerdings nicht auf. Eine Ursache hierfür könnte der in manchen Studien beobachtete Effekt der Omega-3-Fettsäuren sein. Einige Studien beschreiben, dass eine Supplementierung mit Omega-3-FS den Anstieg von IL-6 neutralisiert (DiLorenzo *et al.* 2014; Phillips *et al.* 2003; Tartibian *et al.* 2011). Andere Studien sehen diesen Einfluss nicht (Lenn *et al.* 2002; Toft *et al.* 2000; Nieman *et al.* 2009). Generell scheinen Omega-3-FS allerdings die Produktion von inflammatorischen Cytokinen inklusive IL-6 zu unterdrücken, was sich wiederum positiv auf inflammatorische Prozesse im Körper auswirkt (Caterina & Libby 1996; Khalfoun *et al.* 1997; Manzanares *et al.* 2016; Molfino *et al.* 2017).

5.3.2 Einfluss der Intervention auf die Fettsäurezusammensetzung und den Omega-3-Index

Zur Ermittlung der Compliance der Einnahme des Drinks in der *L&F*-Gruppen, aber auch zur Überprüfung der Orientierung an der empfohlenen mediterranen Diät in den anderen beiden Gruppen, wurde vor Beginn und zum Ende der Studie in allen drei Gruppen eine Fettsäureanalyse im Blut vorgenommen sowie die Bestimmung des HS-Omega-3-Index durchgeführt.

Der HS-Omega-3 Index® wird in den Erythrozyten mit einer speziellen und spezifischen Analytik bestimmt und spiegelt den Anteil von Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) in wichtigen Organen wider. Ein HS-Omega-3 Index zwischen 8 und 12 % gilt als optimal (Schacky *et al.* 2014). Bei der *L&F*-Gruppe führte der regelmäßige Konsum des Omega-3-Drinks zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) des HS-Omega-3-Index (siehe **Abbildung 4.18 B**). Nach der Intervention lag der Omega-3-Index der *L&F*-Gruppe mit 9,4 % im empfohlenen Bereich. Auch eine Studie von Köhler *et al.* (2010) konnte bei Probanden nach

dem 8-wöchigen Konsum eines mit Omega-3-FS angereicherten Getränks einen signifikanten Anstieg des Omega-3 Index beobachten (Köhler *et al.* 2010). Im Vergleich zur *Ls*-Gruppe ist dieser in der *L&F*-Gruppe signifikant höher ($p=0,01$) (siehe **Abbildung 4.18 A**). Interessanterweise konnte in der Kontroll-Gruppe ebenfalls ein leichter Anstieg des Indexes beobachtet werden ($p=0,06$). Die Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA waren in der *L&F*-Gruppe, passend zur signifikanten Erhöhung des Omega-3-Indexes, beim *Visit 2* ebenfalls signifikant erhöht (siehe **Abbildung 4.17 A**). Bei den anderen Fettsäuren kam es zu keiner Veränderung der Konzentrationen im Blut (siehe **Abbildung 4.17 B und C**). Im Vergleich zur *Ls*-Gruppe waren die Gehalte an DHA im Blut in der *L&F*-Gruppe beim *Visit 2* signifikant höher. Bei der Kontroll- und auch bei der *Ls*-Gruppe blieb das Fettsäureprofil unverändert. Damit kann von einem regelmäßigen Verzehr des Getränkes in der *L&F*-Gruppe ausgegangen werden. Der Anstieg des HS-Omega-3-Index in der Kontroll-Gruppe ist allerdings überraschend. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Probanden aufgrund der allgemeinen Ernährungsempfehlungen zu Beginn der Studie ihren Konsum an Omega-3-FS durch einen erhöhten Konsum oder die Einnahme von Supplementen gesteigert haben. Zu Beginn der Studie wurde allen drei Gruppen eine Orientierung an einer mediterranen Ernährung empfohlen. Eine mediterrane Ernährung zeichnet sich u.a. durch eine hohe Zufuhr an mehrfach gesättigten Fettsäuren über Olivenöl und Fisch aus bei gleichzeitig geringer Aufnahme von gesättigten FS (siehe **1.4.1**). Außerdem wurde über den positiven Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die kognitive Funktion aufgeklärt. Alle Gruppen wurden darauf hingewiesen, wenn sie noch keine Omega-3-haltigen Nahrungsergänzungsmittel einnehmen, nicht während der sechsmonatigen Interventionszeit damit anzufangen. Bei der *Ls*- und *L&F*-Gruppe wurde dies regelmäßig bei den Ernährungsberatungen durch eine Befragung kontrolliert. Dies war bei der Kontrollgruppe nicht möglich und kann zu dem unerwarteten Ergebnis beim Omega-3-Index beigetragen haben. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass auch schon eine Erhöhung des Verzehrs von Fisch ohne eine zusätzliche Supplementation zu einer Steigerung des Omega-3-Index beitragen kann (Jackson *et al.* 2019).

5.3.3 Einfluss der Intervention auf mitochondriale Parameter

Als letzter Parameter wurde der Effekt der Intervention auf die mitochondriale Funktion analysiert. Eine mitochondriale Dysfunktion spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von MCI und AD (siehe **1.2.2**). Wie in **Kapitel 4.2.2** und **4.3.2** beschrieben, kann in PBMCs eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion bereits bei gesunden Alten, aber auch bei MCI-Patienten beobachtet werden. Aus diesem Grund scheint die Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs ein geeigneter Marker für die Detektion von frühen Störungen

gen der mitochondrialen Funktion zu sein. Andererseits ist diese Methode aufgrund der einfachen Umsetzung, der geringen Belastung für die Probanden und der niedrigen Kosten geeignet, um den Erfolg von Interventionen zu überwachen und zu erforschen.

Tierstudien konnten bereits zeigen, dass Interventionsbestandteile der hier untersuchten multimodalen Intervention einen positiven Einfluss auf Energiemetabolismus und mitochondriale Funktion haben (Swaminathan & Jicha 2014; Hagl *et al.* 2014; Hagl *et al.* 2015; Hagl *et al.* 2016b; Hagl *et al.* 2016a; Reutzel *et al.* 2018). Eine frühzeitige Prävention einer mitochondrialen Dysfunktion könnte die Entstehung einer MCI oder AD hinauszögern bzw. die Progression der Erkrankung verlangsamen. Deshalb sollte in dieser Studie untersucht werden, ob die beschriebene multimodale Intervention zu einer Verbesserung der mitochondrialen Funktion bei MCI-Patienten beitragen kann.

Vor Beginn der Intervention wurde beim *Visit 1* bei allen Studienteilnehmern in den aus dem Blut isolierten PBMCs die ATP-Spiegel gemessen sowie die CS-Aktivität und die mitochondriale Respiration bestimmt. Die Probanden wurden anschließend zufällig in die drei Gruppen eingeteilt. Die mitochondriale Funktion unterschied sich zu Beginn der Intervention trotz der zufälligen Einteilung nicht. Sowohl bei der CS-Aktivität als auch bei der darauf normierten mitochondrialen Atmung (siehe **Abbildung 4.19 A** und **B**) konnten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen beobachtet werden. Auch der RCR und die ATP-Spiegel waren zwischen den Gruppen gleich (siehe **Abbildung 4.19 C** und **D**). Diese Homogenität bei der mitochondrialen Funktion zu Beginn der Studie ist wichtig, um nach der sechsmonatigen Intervention die Gruppen auch untereinander vergleichen zu können.

Nach Abschluss der Intervention wurde die mitochondriale Funktion, unter Verwendung der gleichen Methodik wie beim *Visit 1*, erneut bestimmt. Beim Vergleich der mitochondrialen Parameter konnte zwischen den drei Gruppen kein Effekt durch die Intervention beobachtet werden. Die CS-Aktivität, die mitochondriale Komplexaktivität sowie der RCR und die ATP-Spiegel unterschieden sich zwischen der *Ls*-, *L&F*- und *Ko*-Gruppe nicht (siehe **Abbildung 4.20**). Auch innerhalb der Gruppen konnte durch die Intervention keine Verbesserung der CS-Aktivität, der RCR oder der ATP-Spiegel im Vergleich zum *Visit 1* beobachtet werden. Die Grundatmung war bei der *Ko*-Gruppe beim *Visit 2* signifikant höher als beim *Visit 1* ($p=0,03$). Bei der Messung der mitochondrialen Atmung zeigte sich beim *Visit 2* bei allen drei Gruppen im Stadium der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) ein signifikanter Anstieg der Aktivität im Vergleich zum *Visit 1* (*Ko*: $p=0,0002$; *Ls*: $p=0,02$; *L&F*: $p=0,005$). Die Komplex IV-Aktivität nahm bei allen drei Gruppen im Vergleich zum *Visit 1* signifikant ab (*Ko*: $p=0,005$; *Ls*: $p=0,01$; *L&F*: $p=0,04$) (siehe **Abbildung 4.20 B** und **Tabelle A2**). Vermutlich liegen diese signifikanten Unterschiede aber nicht an der Intervention, da sie in allen Gruppen in ähnlichem Ausmaß auftreten. Möglicherweise haben hier Fehler in der Methodik diese Effekte hervorgerufen. Interessanterweise

wurde beim *Visit 2* weniger FCCP zur Entkopplung der Atmungskette benötigt als beim *Visit 1*. Es wurde in mehreren Experimenten versucht, die Ursache dafür zu identifizieren, allerdings konnte diese Problematik nicht abschließend geklärt werden. Dies könnte die signifikante Erniedrigung beim KIV erklären, da dieser erst nach der Entkopplung der Atmungskette durch die Injektion von Komplex IV-Substraten gemessen wird. Möglicherweise könnte der Transport des Blutes einen Einfluss gehabt haben, da der *Visit 2* im Winter stattfand, der *Visit 1* im Sommer. Goods *et al.* 2018 konnten einen Einfluss der Transporttemperatur zumindest auf die Zusammensetzung der Isolate beobachten (Goods *et al.* 2018). Allerdings wurden die Proben in beiden Fällen in einer thermoisolierten Box transportiert. Ob der signifikante Anstieg der OXPHOS-Aktivität beim *Visit 2* bei allen Gruppen durch die Intervention hervorgerufen wurde oder durch die Probleme in der Methodik, bleibt fraglich. Die fehlenden Unterschiede in den anderen mitochondrialen Parametern sprechen allerdings eher für einen Zufallsbefund.

Aufgrund des international vorgegebenen Studiendesigns (siehe **3.2.1.4**) wurden weibliche und männliche Probanden gemischt in die Gruppen eingeteilt. Wie in **Kapitel 4.3.1** beschrieben, existieren bei der mitochondrialen Funktion geschlechtsassoziierte Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen MCI-Patienten, weshalb die beiden Geschlechter eigentlich getrennt betrachtet werden müssen. Bei der Auftrennung der Gruppen nach Frauen und Männern konnten ähnliche Ergebnisse wie bei den gemischten Gruppen beobachtet werden. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen sowie innerhalb der Gruppen bei der CS-Aktivität, beim RCR und bei den ATP-Spiegeln beobachtet werden (siehe **Abbildung 4.21** und **Abbildung 4.22 A, C, D**). Bei der mitochondrialen Respiration konnten die bereits beschriebenen Effekte ebenfalls beobachtet werden (siehe **Abbildung 4.21** und **Abbildung 4.22**). Der signifikante Anstieg der Grundatmung bei der Ko-Gruppe beim *Visit 2* konnte allerdings nur bei den weiblichen Probanden beobachtet werden ($p=0,04$) (siehe **Abbildung 4.21 B**). Bei der Ko- und Ls-Gruppe kam es beim *Visit 2* zu einem signifikanten Anstieg der OXPHOS-Aktivität (Ko: $p=0,004$; Ls: $p=0,02$), bei der L&F-Gruppe war der Unterschied nicht signifikant, aber vorhanden (siehe **Abbildung 4.21 B**). Auch bei der Komplex IV-Aktivität zeigte sich bei der Ko- und Ls-Gruppe eine signifikante Abnahme im Vergleich zum *Visit 1* (Ko: $p=0,005$; Ls: $p=0,02$), bei der L&F-Gruppe konnte wieder nur eine tendenzielle Veränderung beobachtet werden. Bei den männlichen Studienteilnehmern stieg die OXPHOS-Aktivität nur in der Ko-Gruppe signifikant an ($p=0,008$), beim Komplex IV zeigte die L&F-Gruppe eine signifikante Abnahme der Aktivität ($p=0,01$) (siehe **Abbildung 4.22 B**). Bei den Ergebnissen der Ls-Gruppe konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden, da nur die Ergebnisse eines Probanden zur Auswertung verwendet werden konnten.

Eine intensive Literaturrecherche ergab, dass bisher keine publizierten Studien zum Einfluss von multimodalen Interventionen auf die mitochondriale Funktion existieren. Die durchgeführten, multimodalen Interventionsstudien untersuchen die Effekte der Intervention auf die kognitive Funktion, Risikofaktoren für AD sowie metabolische Parameter (Andrieu *et al.* 2017; Ngandu *et al.* 2015; van Charante *et al.* 2016), allerdings nicht auf mitochondriale Parameter. Es gibt aber Studien, die den Einfluss der einzelnen Komponenten der multimodalen Intervention auf die mitochondriale Funktion untersucht haben.

Omega-3-FS, wie DHA und EPA, sowie die Lebensmittel, die diese enthalten, konnten bereits in einer Vielzahl von Studien mit einer geringen Inzidenz für AD und Demenz assoziiert werden (Morris *et al.* 2003; Huang *et al.* 2005; Barberger-Gateau *et al.* 2007; Kalmijn *et al.* 1997). Allerdings ist die Wirkung von Omega-3 FS, wenn eine Erkrankung bereits existiert, umstritten. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind in eine Vielzahl von mitochondrialen Prozessen involviert wie z.B. bei der mitochondrialen Calcium-Homöostase, Genexpression, respiratorischen Funktion, ROS-Produktion und mitochondrialen Apoptose (Rohrbach 2009). Außerdem sind in den mitochondrialen Phospholipiden hohe Mengen an DHA vorhanden, was sie essentiell für eine funktionierende mitochondriale Atmungskette macht (Eckert *et al.* 2013). Afshordel *et al.* (2015) konnten zeigen, dass bei alten Mäusen eine Fütterung von Fischöl (enthält DHA und EPA), in auch für den Menschen geeigneten Konzentrationen, die mit dem Alter assoziierten Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion verbessern kann (Afshordel *et al.* 2015). Die in den von alten Tieren isolierten Hirnmitochondrien gemessene niedrigere OXPHOS und KIV-Aktivität konnte bei den alten Mäusen mit der Fischöl-Diät wieder auf das Niveau der jungen Mäuse angehoben werden. Der RCR war im Vergleich zur alten Kontrollgruppe leicht erhöht. In isolierten dissoziierten Hirnzellen (DBC's) konnten bei den alten Mäusen mit dem Fischöl signifikant höhere ATP-Spiegel gemessen werden als bei der Kontrollgruppe. Die Fischöl-Supplementation konnte außerdem anti-apoptotische Faktoren steigern. EPA zeigte in einer anderen Studie neuroprotektive Effekte auf die durch Bestrahlung hervorgerufene Apoptose im Hippocampus von Ratten (Lonergan *et al.* 2002, 2004). Kitajka *et al.* (2002) konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine lebenslange Fütterung mit einer mit Fischöl-angereicherten Diät die Genexpression von Genen für die Untereinheiten der Komplex I, IV und V erhöht (Kitajka *et al.* 2002). Weiterhin zeigen Studien, dass DHA die Amyloid-Ablagerungen bei Mausmodellen der AD reduzieren kann (Grimm *et al.* 2011; Perez *et al.* 2010; Lim *et al.* 2005). Da A β -Akkumulationen eine mitochondriale Dysfunktion hervorrufen können, kann sich eine Reduktion positiv auf die Mitochondrien ausüben (siehe **Abbildung 1.5**).

Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die mitochondriale Funktion wurde ebenfalls bereits in mehreren Studien erforscht. Die körperliche Aktivität kann die kognitive Funktion sowie auch

die Aufmerksamkeit, das Gedächtnis, die Reaktionszeit, Sprache, visual-spatiale und ausführende Funktionen verbessern (Bernardo *et al.* 2016). Physische Aktivität hat außerdem einen positiven Effekt auf viele charakteristische Anzeichen der AD, wie z.B. durch die Regulation der durch oxidativen Stress bedingten Mechanismen im Gehirn (Marques-Aleixo *et al.* 2015b; Radak *et al.* 2001; Radak *et al.* 2013), die Steigerung des Blutflusses und des Metabolismus (La Torre 2002) sowie durch die Verringerung der Akkumulation von A β (Adlard *et al.* 2005). Manche dieser Mechanismen scheinen durch eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion bedingt zu sein. Allerdings ist die Rolle von körperlicher Aktivität bei der Bekämpfung einer AD-bedingten mitochondrialen Dysfunktion noch nicht ganz klar.

Körperliche Aktivität ist mit einem signifikanten Anstieg der metabolischen Stoffwechselrate verbunden, die zu einem Anstieg der ROS-Produktion führt. Allerdings muss beim Anstieg der ROS-Produktion zwischen pathologischer und moderater, kurzzeitiger ROS-Bildung unterschieden werden. Die körperliche Aktivität führt zur Aktivierung von Redox-Signalwegen. Dies kann zu einer Hochregulierung der antioxidativen Komponenten im Gehirn führen (Radak *et al.* 2013). Eine Verbesserung der enzymatischen, antioxidativen Systeme und der consequenten Modulation von oxidativen Schäden kann wiederum Redox-Veränderungen, die mit der Alterung und AD verbunden sind, verhindern. Außerdem kann eine langzeitige Adaption an körperliche Bewegung die ROS-Produktion verringern (Radak *et al.* 2010).

Eine Erhöhung der antioxidativen Schutzsysteme durch körperliche Aktivität könnte zu positiven Effekten auf die mitochondriale Dysfunktion bei AD führen, denn wie bereits gezeigt werden konnte, kommt es zu einer Abnahme von Enzymen wie CAT und SOD in Gehirnen von AD-Patienten (Schuessel *et al.* 2005). Die Hochregulierung von antioxidativen Enzymen konnte in Tierstudien mit AD-Modellen beobachtet werden. Durch chronische körperliche Aktivität kam es zu einer Steigerung der Expression und Aktivität der SOD, GPx und CAT (García-Mesa *et al.* 2012; Leem *et al.* 2009; Um *et al.* 2011). Körperliche Aktivität kann außerdem SIRT3 bei AD-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhen (Bo *et al.* 2014). Eine Hochregulierung von SIRT3 führt zu einer reduzierten ROS-Produktion und Apoptose.

Neben der Abnahme der antioxidativen Schutzsysteme kann es bei der Alterung und AD, wie in **Kapitel 1.2.2** beschrieben, zu einer gesteigerten Schädigung der mtDNA durch ROS kommen. García-Mesa *et al.* (2012) konnten zeigen, dass langzeitiges Laufradtraining bei 3xTg-AD-Mäusen die mtDNA Spiegel konstant hält, wohingegen diese in der Kontrollgruppe erniedrigt waren (García-Mesa *et al.* 2012). Eine andere Studie an APP/PS1-transgenen Mäusen, ebenfalls ein Mausmodell der AD, konnte eine Hochregulierung der Reparaturkapazität der mtDNA durch körperliche Aktivität beobachten (Bo *et al.* 2014). Bei der Alterung und AD kann es auch zu Störungen der Calciumretentionskapazität kommen (siehe **Abbildung 1.5**), die wiederum zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) führt und

damit zur Ausschüttung von apoptotischen Faktoren. Diese induzieren dann die Apoptose von Zellen und es kann zum Absterben von Neuronen kommen. Marques-Aleixo *et al.* (2015) konnten in ihrer Studie mit männlichen Ratten zeigen, dass chronisches Ausdauertraining die calcium-induzierte Öffnung der mPTP verhindert und so zu einer Abnahme von apoptotischen Markern und der Apoptose führt (Marques-Aleixo *et al.* 2015a). Körperliche Aktivität konnte in Tierstudien außerdem die Spiegel an A β (Adlard *et al.* 2005; Mirochnic *et al.* 2009) und phosphorylierten Tau (Leem *et al.* 2009) reduzieren, was sich wiederum positiv auf die mitochondriale Funktion ausüben kann (siehe **Abbildung 1.5**).

Die Menge sowie die Aktivität von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette scheinen ebenfalls durch körperliche Aktivität gesteigert werden zu können (Ding *et al.* 2006; Kirchner *et al.* 2008). Marques-Aleixo *et al.* (2015) konnten in männlichen Ratten durch körperliche Aktivität eine höhere mitochondriale Atmung, RCR und ATP-Produktion beobachten. Außerdem war die Menge an Komplex I, II und V-Untereinheiten in den Mitochondrien des Cortex und Cerebellums erhöht. Die Aktivität des Komplex I und V konnte ebenfalls gesteigert werden (Marques-Aleixo *et al.* 2015a). Bo *et al.* (2014) konnten in einer Studie mit APP/SP1-Mäusen eine Steigerung der Aktivität der Komplexe I, IV und V nach Ausdauertraining beobachten (Bo *et al.* 2014). Andere Studien konnten diesen Anstieg nicht bestätigen (García-Mesa *et al.* 2012). Ob die körperliche Aktivität in der MIND AD_{mini}-Studie auch die Komplexaktivität gesteigert hat, ist leider aufgrund der methodischen Probleme schwierig zu beurteilen. Allerdings konnte keine Steigerung des RCR oder der ATP-Spiegel durch die sechsmonatige körperliche Bewegung beobachtet werden, wie es in den Tierstudien gezeigt werden konnte.

Körperliche Aktivität kann einer mitochondrialen Dysfunktion bei der Alterung und AD außerdem noch durch die Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese entgegenwirken. Eine ausgeglichene mitochondriale Biogenese ist essentiell für eine hohe Funktionalität der Mitochondrien. Die mitochondriale Biogenese kann durch körperliche Aktivität über eine Aktivierung von SIRT1 und PGC-1 α beeinflusst werden (Steiner *et al.* 2011). In der Studie von Marques-Aleixo *et al.* (2015) führte die körperliche Aktivität zu höheren PGC-1 α und TFAM Gehalten im Gehirn (Marques-Aleixo *et al.* 2015a).

Omega-3-FS und körperliche Aktivität können somit die mitochondriale Funktion positiv beeinflussen. Jedoch beruhen die beschriebenen Erkenntnisse nur auf Ergebnissen aus Tierstudien. Weitere klinische Studien wären sinnvoll, um zu untersuchen, ob diese positiven Effekte auf die mitochondriale Funktion auch bei alten Menschen und Personen mit MCI oder AD vorkommen oder hier die Übertragbarkeit vom Tier auf den Menschen nicht möglich ist.

Studien, die den Effekt von kognitivem Training auf die mitochondriale Funktion untersuchen, konnten nicht gefunden werden. In diesen Studien werden, wie auch bei den multimodalen

Ansätzen, meist die Auswirkungen auf die kognitive Funktion oder Veränderungen der Hirnstruktur untersucht (Basak *et al.* 2008; Borella *et al.* 2010; Rebok *et al.* 2014; Anguera *et al.* 2013; Chapman *et al.* 2015; Cao *et al.* 2016).

Durch die methodischen Probleme bei der Messung der mitochondrialen Atmung können diese Ergebnisse nur begrenzt zur Beurteilung des Einflusses der sechsmonatigen multimodalen Intervention herangezogen werden. Die CS-Aktivität unterschied sich allerdings zwischen den Gruppen nicht. Durch die multimodale Intervention konnte damit keine Steigerung der mitochondrialen Masse erreicht werden. Auch die ATP-Spiegel konnten durch die Intervention nicht erhöht werden.

Die fehlenden Effekte können auf der einen Seite dadurch begründet sein, dass multimodale Ansätze nicht der geeignete Ansatz zur Verbesserung der mitochondrialen Funktion sind. Denn in der Literatur zeigen die einzelnen Interventionskomponenten zumindest in Tierstudien auch bei AD-Modellen vielversprechende Effekte auf die Verbesserung der mitochondrialen Funktion.

Auf der anderen Seite können die Ergebnisse durch eine geringe Compliance, z.B. bei der sportlichen Aktivität sowie bei der Einhaltung der mediterranen Diät in der *Ls*- und *L&F*-Gruppe, bedingt sein. Der Omega-3 Drink wurde allerdings von den Teilnehmern der *L&F*-Gruppe regelmäßig eingenommen (siehe **Abbildung 4.18**).

Möglicherweise muss eine Intervention bereits früher erfolgen, wenn noch keine mitochondrialen Beeinträchtigungen detektiert werden können. Wie die Ergebnisse in **Abbildung 4.26** und **Tabelle 4.10** zeigen, wiesen die MCI-Patienten beim *Visit 1* eine signifikant niedrigere mitochondriale Funktion auf als gleichaltrige gesunde Probanden.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Studie war die geringe Probandenanzahl von insgesamt nur 24 Probanden, d.h., in jeder Gruppe waren zu Beginn der Studie bereits nur acht Probanden. Wurden die Gruppen noch nach den Geschlechtern aufgeteilt, bestanden manche Gruppen nur noch aus zwei Personen. Um validere Ergebnisse zu erhalten, müsste solch eine Studie nochmal mit einer größeren Teilnehmerzahl durchgeführt werden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte die Methode der Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs etabliert und auf ihre Eignung zur Detektion von Unterschieden in der mitochondrialen Funktion untersucht werden.

Die Verwendung von speziellen Zentrifugationsröhrchen mit einer porösen Membran oder herkömmlichen Röhrchen übte sich nicht auf die Zellausbeute, Reinheit und Zusammensetzung des Isolates oder auf die mitochondriale Funktion aus. Allerdings könnten diese speziellen, erheblich teureren Reaktionsgefäße eine schnelle Aufarbeitung ermöglichen und die Ergebnisse unabhängiger vom durchführenden Experimentator machen. Für Studien mit einer hohen Probenanzahl und verschiedenen Experimentatoren kann eine Verwendung dieser speziellen Röhrchen durchaus sinnvoll sein, um die Lagerzeit zu verkürzen sowie homogenere Isolationsergebnisse zu erreichen.

Das Hormon Melatonin kann aufgrund seines antioxidativen Charakters einen Einfluss auf die Messung der mitochondrialen Funktion ausüben. Eine entsprechende Assoziation konnte in der dazu durchgeführten Studie bei den männlichen Studienteilnehmern beobachtet werden. Deshalb empfiehlt es sich, bei der Durchführung von mitochondrialen Untersuchungen in PBMCs, die Blutabnahme immer zur gleichen Zeit durchzuführen. Ist dies nicht möglich, ist eine Erfassung des Schlafverhaltens und der Melatoninspiegel essentiell, um eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen.

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der mitochondrialen Funktion in den PBMCs und dem Gehirn konnte zu keinen endgültigen Ergebnissen führen. Es konnte eine Tendenz zu einer positiven Korrelation zwischen den ATP-Spiegeln und der CS-Aktivität in PBMCs und der NAA-Konzentration in der weißen und grauen Substanz beobachtet werden. Aufgrund der geringen Probandenanzahl war diese allerdings nicht signifikant. Aus diesem Grund sollte dieser Zusammenhang in der PECEMA-Studie mit einer größeren Probandenanzahl erneut erforscht werden. Ob die mitochondriale Funktion in PBMCs auch Veränderungen der Funktion im Gehirn widerspiegelt, kann erst nach der Auswertung der Hirndaten der PECEMA-Studie abschließend beurteilt werden.

Beim Vergleich der mitochondrialen Funktion in PBMCs von jungen und gesunden alten Probanden konnte ein altersassoziierter Unterschied beobachtet werden. Eine signifikante Abnahme der ATP-Spiegel sowie der Komplex IV-Aktivität im Vergleich zu den jungen Probanden ist bereits bei kognitiv gesunden alten Probanden identifizierbar. Dies zeigt, dass die Methode sensitiv genug ist, um frühzeitige Veränderungen der mitochondrialen Funktion zu detektieren. Bei MCI-Patienten konnte, im Vergleich zu den jungen und alten Probanden, ebenfalls eine

signifikant niedrigere mitochondriale Funktion beobachtet werden. Alle Veränderungen wurden sowohl bei Männern als auch bei Frauen identifiziert.

Neben dem Alter kann auch das Geschlecht die mitochondriale Funktion beeinflussen. In allen durchgeführten Studien zeigten die weiblichen Probanden eine signifikant bessere mitochondriale Funktion als die männlichen Probanden im gleichen Alter. Dieser Unterschied kann nicht nur bei den Frauen im reproduktionsfähigen Alter beobachtet werden, sondern auch bei den älteren gesunden Frauen und den weiblichen MCI-Patienten. Diese Ergebnisse bestärken den Einschluss des Geschlechtes als biologische Variable in klinischen und präklinischen Studien. Es ist wichtig, beide Geschlechter getrennt in Studien zu betrachten und nicht nur ein Geschlecht oder gemischte Gruppen zu inkludieren. Dies trifft vor allem auf die Erforschung von Erkrankungen zu, bei denen die mitochondriale Dysfunktion eine wichtige Rolle spielt.

In einer letzten Studie sollte unter Verwendung der Methode der Einfluss einer sechsmonatigen, multimodalen Intervention auf die mitochondriale Funktion von MCI-Patienten untersucht werden. Hier konnten keine Effekte der Intervention auf die mitochondrialen Parameter beobachtet werden. Dies kann an einer geringen *Compliance* der Studienteilnehmer liegen oder durch die geringe Anzahl an Probanden bedingt sein. Es müsste nochmal eine größere Studie mit einer strikteren Überwachung der Einhaltung der Interventionsaspekte durchgeführt werden, um eine finale Aussage über den Einfluss von multimodalen Interventionen auf die mitochondriale Funktion in PBMCs treffen zu können. Nachdem noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob ein Zusammenhang zwischen Gehirn und der Peripherie besteht, können positive Effekte der Intervention auch nur im Gehirn aufgetreten sein.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs, unter Berücksichtigung des Einflusses von externen Faktoren wie dem Melatonin und geschlechtsassoziierten Unterschieden, eine geeignete und kostengünstige Methode darstellt, um Veränderungen der mitochondrialen Funktion auch schon in gesunden, älteren Probanden zu detektieren. Das macht die Methode zu einem geeigneten Marker in der Diagnostik von mitochondrialen Dysfunktionen, die z.B. im Rahmen einer Demenz auftreten können. Außerdem kann die Methode zur Überwachung des Erfolges von Präventions- und Therapieansätzen, die das Mitochondrium als Ziel haben, von Nutzen sein. Ob die mitochondriale Funktion in PBMCs allerdings auch Veränderungen der Funktion im Gehirn widerspiegelt, bedarf noch weiterer Erforschung.

6 Zusammenfassung

Die Lebenserwartung ist in den letzten Jahren immer weiter angestiegen und führt in Kombination mit zurückgehenden Geburtenraten zu einer Alterung der Gesellschaft. In den nächsten 30 Jahren wird sich der Anteil von über 60-Jährigen an der Weltpopulation dadurch nahezu verdoppeln. Das Altern bringt allerdings auch ein erhöhtes Risiko für verschiedene Erkrankungen mit sich. Hierbei spielen vor allem die neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle, da sich die damit verbundenen Beeinträchtigungen langfristig auf die physische und psychische Gesundheit ausüben. Die Demenzerkrankung betrifft besonders viele Personen. Schon heute sind mehr als 47 Millionen Menschen weltweit von einer Demenz betroffen und diese Zahl wird sich voraussichtlich bis 2050 sogar verdreifachen. Da die persönlichen, sozialen und ökonomischen Konsequenzen der Demenz enorm sind, ist es umso wichtiger, effektive Präventions- und Therapieansätze zu entwickeln und frühzeitige und kostengünstige Diagnosemöglichkeiten zu etablieren. Die häufigste Demenzform ist die Alzheimer Erkrankung (AD), deren häufigste Form sporadisch auftritt und deren Ursache multifaktoriell ist. Die physiologische Alterung ist der wichtigste Risikofaktor für die sporadische Form der AD. Eine mitochondriale Dysfunktion spielt sowohl bei der Alterung als auch bei der AD eine entscheidende Rolle und rückt auch aufgrund des Scheiterns anderer potenzieller Targets zur Bekämpfung der Erkrankung, wie z.B. Amyloid β , immer mehr in den Fokus der Forschung. Allerdings ist die Bestimmung der mitochondrialen Funktion im Gehirn des lebenden Menschen nur über die teure und aufwendige Magnetresonanztomographie (MRS), die bislang weder etabliert noch validiert ist, oder durch eine postmortale Gewebeentnahme möglich. Einige Studien konnten jedoch zeigen, dass Veränderungen des Energiemetabolismus bei der Alterung nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Peripherie auftreten. Aus diesem Grund scheinen periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) ein geeignetes Kompartiment für die Erforschung der mitochondrialen Funktion zu sein. Zusätzlich zur einfachen und kostengünstigen Gewinnung und Verfügbarkeit, spielen sie eine wichtige Rolle in der Immunantwort und teilen einen Großteil der nicht synaptischen Umgebung der Neuronen.

Vor diesem Hintergrund war das Hauptziel der vorliegenden Dissertation, herauszufinden, ob die Messung der mitochondrialen Funktion in PBMCs eine geeignete Methode darstellt, um Veränderungen in den Mitochondrien zu detektieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde hierzu die Methode zunächst etabliert und mögliche Einflussfaktoren wurden identifiziert. Der Vergleich zweier Zentrifugationsröhrchen und deren Einfluss auf die Zellausbeute, die Reinheit und Zusammensetzung des Isolates sowie auf die mitochondriale Funktion zeigte keine Unterschiede.

In einer zweiten Studie wurde der Einfluss des in circadianen Rhythmen ausgeschütteten, Hormons Melatonin auf die mitochondriale Funktion erforscht. Melatonin ist ein effektives Antioxidanz und kann dadurch Messungen der mitochondrialen Funktion beeinflussen. In der Studie konnte bei den männlichen Probanden eine Assoziation zwischen dem Melatonin und der mitochondrialen Aktivität identifiziert werden.

Nach Abschluss der Etablierung wurde die Methode im zweiten Teil der Arbeit zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der mitochondrialen Funktion im Gehirn und in der Peripherie eingesetzt. Hierzu wurden die in den PBMCs von jungen gesunden Probanden, gemessene Citratsynthase (CS)-Aktivität sowie die ATP-Spiegel mit den im Gehirn gemessenen N-Acetylaspartat (NAA)-Konzentrationen korreliert. Die Ergebnisse der Studie zeigen eine Tendenz zu einer positiven Korrelation zwischen den mitochondrialen Parametern im Gehirn und im Blut. Die fehlende Signifikanz der Ergebnisse könnte an der geringen Anzahl der Studienteilnehmer liegen und bedeutet nicht zwangsläufig, dass zwischen der mitochondrialen Funktion im Gehirn und der Peripherie keine Beziehung besteht.

Im Rahmen einer anderen Studie wurde untersucht, ob sich Veränderungen der mitochondrialen Funktion in PBMCs nicht nur, wie in der Literatur beschrieben, bei AD-Patienten detektieren lassen, sondern auch bereits bei kognitiv gesunden alten Probanden. Hierbei konnten altersassoziierte Unterschiede beobachtet werden. Die jungen Frauen und Männer wiesen signifikant höhere ATP-Spiegel und Komplex IV-Aktivitäten auf als die weiblichen und männlichen alten Probanden. Dies deutet auf eine altersbedingte Abnahme der mitochondrialen Funktion hin. Beim Vergleich der Ergebnisse mit MCI-Patienten konnte sowohl in den jungen als auch in den alten Probanden eine signifikant höhere mitochondriale Funktion gemessen werden. Dies bestätigt erneut, dass die mitochondriale Dysfunktion bei der Entstehung der AD eine entscheidende Rolle spielt. Neben den altersassoziierten Unterschieden wurde in einer weiteren Studie der Einfluss des Geschlechts auf die mitochondriale Funktion erforscht. Hier, aber auch in den anderen durchgeführten Studien, zeigten sich geschlechtsassoziierte Unterschiede in der mitochondrialen Funktion in PBMCs. Die Komplex IV-Aktivität war in allen Studien bei den weiblichen Probanden signifikant höher als bei den Männern und auch die ATP-Spiegel lagen tendenziell in einem höheren Bereich. Diese Erkenntnisse unterstützen die Notwendigkeit der Inkludierung von sowohl weiblichen als auch männlichen Probanden bei Studien, die die mitochondriale Funktion erforschen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die PBMC-Methode genutzt, um den Einfluss einer sechsmo-
natigen Intervention auf die mitochondriale Funktion in PBMCs von MCI-Patienten zu untersuchen. Es konnten keine Effekte der Intervention auf die in den PBMCs gemessenen mitochondrialen Parametern beobachtet werden.

Aus den Ergebnissen der Studien lässt sich schlussfolgern, dass die Zentrifugationsröhrchen keinen Einfluss auf die Zellausbeute, die Reinheit oder die mitochondriale Funktion haben. Trotzdem könnte bei Studien mit einer hohen Probenanzahl und wechselnden Experimentatoren die Verwendung von Zentrifugationsgefäßen mit einer porösen Membran sinnvoll sein, um die Homogenität der Ergebnisse zu erhöhen und die Lagerzeit zu verkürzen. Die Blutabnahme sollte im Rahmen von Studien zur Vermessung der mitochondrialen Funktion immer zum gleichen Zeitpunkt stattfinden. Außerdem sollte zu diesem Zeitpunkt möglichst kein Melatonin mehr im Blut vorhanden sein. Ist dies bei einem Studiendesign nicht umsetzbar, so muss eine Erfassung der Melatoninkonzentrationen oder des Schlafverhaltens durchgeführt werden. Nur so kann ein Einfluss des antioxidativen Hormons auf die mitochondriale Funktion ausgeschlossen werden. Auswirkungen einer multimodalen Intervention auf die mitochondriale Funktion konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Aufgrund von Limitationen der Studie, wie einer geringen Probandenanzahl und der Compliance der Studienteilnehmer, muss der Einfluss allerdings noch in weiteren Studien untersucht werden.

Unter Berücksichtigung dieser Einflussfaktoren und der geschlechtsassoziierten Unterschiede der mitochondrialen Funktion, ist die Messung von mitochondrialen Parametern in PBMCs eine geeignete und kostengünstige Methode, um Veränderungen der mitochondrialen Funktion frühzeitig zu detektieren. Die Methode kann auch bei der Überwachung des Erfolges von Präventions- und Therapieansätzen, die das Mitochondrium als Ziel haben, von großem Nutzen sein.

7 Summary

Bioenergetic measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) - Influence of age, sex and circadian rhythm

Life expectancy has risen steadily in recent years and, in combination with declining birth rates, is leading to an aging society. In the next 30 years, the proportion of the world population over 60 will almost double. However, ageing also entails an increased risk of various sufferings. Neurodegenerative diseases in particular play an important role here. Especially, Dementia affects the aging population. More than 47 million people worldwide are already affected by dementia today, and this number is expected to triple by 2050. Since the personal, social and economic consequences of dementia are enormous, it is crucial to develop effective prevention strategies and therapy approaches and to establish early and cost-effective diagnostic options. The most common form of dementia is Alzheimer's disease (AD). Comparable to physiological aging, the cause of the disease is multifactorial. A mitochondrial dysfunction seems to play a critical role in both, aging and AD, and is becoming more and more the focus of research. This is also due to the failure of other potential targets to combat the disease, such as amyloid β . However, the determination of mitochondrial function in the brain of living humans is only possible by expensive and complex magnetic resonance spectroscopy (MRS) or by invasive tissue sampling. However, some studies have shown that changes in energy metabolism during aging occur not only in the brain but also in the periphery. Peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) appear to be a suitable compartment for research into mitochondrial function. In addition to simple and inexpensive generation and availability, they play an important role in the immune response and share much of the non-synaptic environment of neurons.

For this reason, the main objective of this dissertation was to investigate whether the measurement of mitochondrial function in PBMCs is a suitable method to detect changes in mitochondria.

In the first part of the thesis, the method was established and possible influencing factors were identified. The comparison of two centrifugation tubes and their influence on the cell yield, the purity and composition of the isolate as well as on the mitochondrial function showed no differences. A second study investigated the influence of melatonin, a hormone secreted in circadian rhythms, on mitochondrial function. Melatonin is an effective antioxidant and can influence measurements of mitochondrial function. The study identified an association between melatonin and mitochondrial activity in male volunteers.

After the establishment of the method, a possible association of mitochondrial function in the brain and periphery was investigated. The measured citrate synthase (CS) activity and the

ATP levels in PBMCs of young healthy volunteers, were correlated with the N-acetylaspartate (NAA) concentrations measured in the brain. The results of the study show a tendency towards a positive correlation between mitochondrial parameters in the brain and blood. The lack of significance of the results may be due to the small number of participants and does not necessarily mean that there is no relationship between mitochondrial function in the brain and periphery. Another study investigated whether changes in mitochondrial function in PBMCs could be detected not only in AD patients, but also in cognitively healthy old subjects. Age-associated differences were observed. The young women and men showed significantly higher ATP levels and complex IV activities than the female and male old volunteers. This indicates an age-related decrease in mitochondrial function. Comparing the results with patients with mild cognitive impairments (MCI), a significantly higher mitochondrial function was measured in both young and old volunteers. This confirms the decisive role of mitochondrial dysfunction in the development of AD. In addition to age-related differences, another study investigated the influence of sex on mitochondrial function. Here, but also in the other studies, gender-associated differences in mitochondrial function were found in PBMCs. In all studies, Complex IV activity was significantly higher in female subjects than in males and ATP levels tended to be higher. This finding supports the need to include both female and male subjects in studies investigating mitochondrial function. In the last part of the work, the PBMC method was used to investigate the influence of a six-month multimodal intervention on mitochondrial function in PBMCs of MCI patients. No effects of the intervention on mitochondrial parameters measured in PBMCs could be observed. From the results of the studies it can be concluded that the centrifuge tubes have no influence on cell yield, purity or mitochondrial function. Nevertheless, in studies with a large number of samples and changing experimenters, the use of centrifuge tubes with a porous membrane may be useful to increase homogeneity of results and reduce storage time. Blood collection should always take place at the same time in mitochondrial function studies. In addition, if possible, melatonin should no longer be present in the blood at this time. If this is not feasible in a study design, the melatonin concentrations or sleep behaviour must be recorded. This is the only way to exclude the influence of the antioxidative hormone on mitochondrial function. Effects of multimodal intervention on mitochondrial function could not be observed in the present study. Due to limitations of this study, such as a small number of test persons and the compliance of the study participants, the influence still has to be investigated in further studies.

Considering these influencing factors and the gender-associated differences in mitochondrial function, the measurement of mitochondrial parameters in PBMCs is a suitable and cost-effective method for early detection of changes in mitochondrial function. The method can also be useful in monitoring the success of prevention and therapy approaches targeting mitochondria.

8 Literaturverzeichnis

- Abo Taleb HA, Alghamdi BS (2020) Neuroprotective Effects of Melatonin during Demyelination and Remyelination Stages in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **70**, 386–402.
- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW (2005) Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 4217–4221.
- Adzic M, Mitic M, Radojic M (2017) Mitochondrial estrogen receptors as a vulnerability factor of chronic stress and mediator of fluoxetine treatment in female and male rat hippocampus. *Brain research*, **1671**, 77–84.
- Afshordel S, Hagl S, Werner D, Röhner N, Kögel D, Bazan NG, Eckert GP (2015) Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging--impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, **92**, 23–31.
- Agil A, El-Hammadi M, Jiménez-Aranda A, Tassi M, Abdo W, Fernández-Vázquez G, Reiter RJ (2015) Melatonin reduces hepatic mitochondrial dysfunction in diabetic obese rats. *Journal of pineal research*, **59**, 70–79.
- Ahmad T, Sundar IK, Lerner CA, Gerloff J, Tormos AM, Yao H, Rahman I (2015) Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **29**, 2912–2929.
- Alamili M, Bendtzen K, Lykkesfeldt J, Rosenberg J, Gögenur I (2014) Melatonin suppresses markers of inflammation and oxidative damage in a human daytime endotoxemia model. *Journal of critical care*, **29**, 184.e9-184.e13.
- Albarran MT, Lopez-Burillo S, Pablos MI, Reiter RJ, Agapito MT (2001) Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. *Journal of pineal research*, **30**, 227–233.
- Alonso JR, Cardellach F, Casademont J, Miró O (2004) Reversible inhibition of mitochondrial complex IV activity in PBMC following acute smoking. *The European respiratory journal*, **23**, 214–218.
- Alzheimer Europe (2018) Alzheimer Europe - Research - European Collaboration on Dementia - Prevalence of dementia - Prevalence of dementia in Europe. Available via <https://www.alzheimer-europe.org/EN/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe>. Accessed 12 Aug 2019.
- Alzheimer's Association (2019) Alzheimer's Association Statement on Amgen, Novartis and Banner Decision to Stop BACE1 Inhibitor Arm. Available via <https://www.alz.org/news/2019/amgen-novartis-and-banner-stop-bace1-inhibitor-ar>. Accessed 12 Aug 2019.
- Anderson G, Maes M (2014) Oxidative/nitrosative stress and immuno-inflammatory pathways in depression: treatment implications. *Current pharmaceutical design*, **20**, 3812–3847.
- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL (2005) Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nature reviews. Neuroscience*, **6**, 829–840.

- Andrieu S, Guyonnet S, Coley N *et al.* (2017) Effect of long-term omega 3 polyunsaturated fatty acid supplementation with or without multidomain intervention on cognitive function in elderly adults with memory complaints (MAPT): a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, **16**, 377–389.
- Anglin RE, Mazurek MF, Tarnopolsky MA, Rosebush PI (2012) The mitochondrial genome and psychiatric illness. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, **159B**, 749–759.
- Anguera JA, Boccanfuso J, Rintoul JL *et al.* (2013) Video game training enhances cognitive control in older adults. *Nature*, **501**, 97–101.
- Antolín I, Rodríguez C, Saínez RM *et al.* (1996) Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **10**, 882–890.
- Areti A, Komirishetty P, Akuthota M, Malik RA, Kumar A (2017) Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and promotes neuroprotection by inducing autophagy during oxaliplatin-evoked peripheral neuropathy. *Journal of pineal research*, **62**.
- Arosio B, D'Addario C, Gussago C *et al.* (2014) Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Laboratory to Study Dementia in the Elderly. *BioMed research international*, **2014**.
- Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Des Richardson R, Morris DL (2014) Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *Journal of clinical pathology*, **67**, 932–937.
- Austad SN, Fischer KE (2016) Sex Differences in Lifespan. *Cell metabolism*, **23**, 1022–1033.
- Bäckman L, Nyberg L, Lindenberger U, Li S-C, Farde L (2006) The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **30**, 791–807.
- Bai X-Z, He T, Gao J-X *et al.* (2016) Melatonin prevents acute kidney injury in severely burned rats via the activation of SIRT1. *Scientific reports*, **6**, 32199.
- Baloyannis SJ, Costa V, Michmizos D (2004) Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, **19**, 89–93.
- Bamidis PD, Vivas AB, Styliadis C, Frantzidis C, Klados M, Schlee W, Siountas A, Papageorgiou SG (2014) A review of physical and cognitive interventions in aging. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **44**, 206–220.
- Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Pérès K, Dartigues J-F, Renaud S (2002) Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, **325**, 932–933.
- Barberger-Gateau P, Raffaitin C, Letenneur L, Berr C, Tzourio C, Dartigues JF, Alpérovitch A (2007) Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology*, **69**, 1921–1930.
- Bartolotti N, Bennett DA, Lazarov O (2016) Reduced pCREB in Alzheimer's disease prefrontal cortex is reflected in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular psychiatry*, **21**, 1158–1166.
- Basak C, Boot WR, Voss MW, Kramer AF (2008) Can Training in a Real-Time Strategy Videogame Attenuate Cognitive Decline in Older Adults? *Psychology and aging*, **23**, 765–777.

- Bates TE, Strangward M, Keelan J, Davey GP, Munro PM, Clark JB (1996) Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for 1H MRS studies in vivo. *Neuroreport*, **7**, 1397–1400.
- Bayod S, Guzmán-Brambila C, Sanchez-Roige S, Lanza JF, Kaliman P, Ortuño-Sahagun D, Escorihuela RM, Pallàs M (2015) Voluntary exercise promotes beneficial anti-aging mechanisms in SAMP8 female brain. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **55**, 525–532.
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, **78**, 547–581.
- Berchtold NC, Cribbs DH, Coleman PD *et al.* (2008) Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15605–15610.
- Bernardo TC, Marques-Aleixo I, Beleza J, Oliveira PJ, Ascensão A, Magalhães J (2016) Physical Exercise and Brain Mitochondrial Fitness: The Possible Role Against Alzheimer's Disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **26**, 648–663.
- Berti V, Walters M, Sterling J *et al.* (2018) Mediterranean diet and 3-year Alzheimer brain biomarker changes in middle-aged adults. *Neurology*, **90**, e1789-e1798.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature genetics*, **39**, 17–23.
- Bo H, Kang W, Jiang N, Wang X, Zhang Y, Ji LL (2014) Exercise-induced neuroprotection of hippocampus in APP/PS1 transgenic mice via upregulation of mitochondrial 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2014**, 834502.
- Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF (2013) Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in oncology*, **3**, 292.
- Borella E, Carretti B, Riboldi F, Beni R de (2010) Working memory training in older adults: evidence of transfer and maintenance effects. *Psychology and aging*, **25**, 767–778.
- Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV, Viña J (2010) Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, **1802**, 205–211.
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free radical biology & medicine*, **34**, 546–552.
- Boveris A, Navarro A (2008) Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB life*, **60**, 308–314.
- Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Annals of neurology*, **57**, 695–703.
- Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G (2002) N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of medicine*, **112**, 298–304.
- Bugg JM, Shah K, Villareal DT, Head D (2012) Cognitive and neural correlates of aerobic fitness in obese older adults. *Experimental aging research*, **38**, 131–145.

- Calton EK, Keane KN, Soares MJ, Rowlands J, Newsholme P (2016) Prevailing vitamin D status influences mitochondrial and glycolytic bioenergetics in peripheral blood mononuclear cells obtained from adults. *Redox biology*, **10**, 243–250.
- Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*, **84**, 277–359.
- Cao X, Yao Y, Li T *et al.* (2016) The Impact of Cognitive Training on Cerebral White Matter in Community-Dwelling Elderly: One-Year Prospective Longitudinal Diffusion Tensor Imaging Study. *Scientific reports*, **6**.
- Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR (2004) Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiology of aging*, **25**, 105–110.
- Caterina R de, Libby P (1996) Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids*, **31 Suppl**, S57-63.
- Cesari F, Sofi F, Caporale R *et al.* (2009) Relationship between exercise capacity, endothelial progenitor cells and cytochemokines in patients undergoing cardiac rehabilitation. *Thrombosis and haemostasis*, **101**, 521–526.
- Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Johnson MS, Hardy RW, Ballinger SW, Darley-Usmar VM (2013) Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **93**, 690–700.
- Chapman SB, Aslan S, Spence JS *et al.* (2015) Neural Mechanisms of Brain Plasticity with Complex Cognitive Training in Healthy Seniors. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **25**, 396–405.
- Chinnery PF, Hudson G (2013) Mitochondrial genetics. *British medical bulletin*, **106**, 135–159.
- Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV (2014) Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *BioMed research international*, **2014**, 238463.
- Chomyn A, Attardi G (2003) MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, **304**, 519–529.
- Christensen H (2001) What cognitive changes can be expected with normal ageing? *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, **35**, 768–775.
- Cifre M, Palou A, Oliver P (2018) Cognitive impairment in metabolically-obese, normal-weight rats: identification of early biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular neurodegeneration*, **13**, 14.
- Clark JB (1998) N-acetyl aspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction. *Developmental neuroscience*, **20**, 271–276.
- Clarkson PM, Hubal MJ (2002) Exercise-induced muscle damage in humans. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, **81**, S52-69.
- Claustrat B, Leston J (2015) Melatonin: Physiological effects in humans. *Neuro-Chirurgie*, **61**, 77–84.

- Colcombe SJ, Kramer AF, Erickson KI *et al.* (2004) Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 3316–3321.
- Cooper JM, Mann VM, Schapira AHV (1992) Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: Effect of ageing. *Journal of the Neurological Sciences*, **113**, 91–98.
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N (1992) A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 7370–7374.
- Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2001) Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD. *Neurology*, **57**, 260–264.
- Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D *et al.* (2011) Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: a systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data. *Journal of the American College of Cardiology*, **57**, 1877–1886.
- Cristòfol R, Porquet D, Corpas R, Coto-Montes A, Serret J, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C (2012) Neurons from senescence-accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol. *Journal of pineal research*, **52**, 271–281.
- Crouch PJ, Blake R, Duce JA *et al.* (2005) Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 672–679.
- Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K (2019) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, **5**, 272–293.
- Cummings SR (2007) The biology of aging. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, **7**, 340–341.
- Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P (2011) Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry international*, **58**, 700–707.
- DAG - Deutsche Adipositas Gesellschaft (2014) Evidenzbasierte Leitlinien Prävention und Therapie der Adipositas. Available via <https://www.adipositas-gesellschaft.de/index.php?id=9>. Accessed 10 Sep 2019.
- Dautry C, Vaufrey F, Brouillet E, Bizat N, Henry PG, Condé F, Bloch G, Hantraye P (2000) Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal dysfunction in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **20**, 789–799.
- Delbarba A, Abate G, Prandelli C *et al.* (2016) Mitochondrial Alterations in Peripheral Mononuclear Blood Cells from Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Patients. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2016**, 5923938.
- Demarest TG, McCarthy MM (2015) Sex differences in mitochondrial (dys)function: Implications for neuroprotection. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **47**, 173–188.

- DESTATIS (2019) Lebenserwartung. Available via https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2019/11/PD19_427_12621.html. Accessed 26 Jan 2020.
- DiLorenzo FM, Drager CJ, Rankin JW (2014) Docosahexaenoic acid affects markers of inflammation and muscle damage after eccentric exercise. *Journal of strength and conditioning research*, **28**, 2768–2774.
- Ding Q, Vaynman S, Souda P, Whitelegge JP, Gomez-Pinilla F (2006) Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *The European journal of neuroscience*, **24**, 1265–1276.
- Djordjevic J, Thomson E, Chowdhury SR, Snow WM, Perez C, Wong TP, Fernyhough P, Albenisi BC (2017) Brain region- and sex-specific alterations in mitochondrial function and NF- κ B signaling in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **361**, 81–92.
- Dominy JE, Puigserver P (2013) Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **5**.
- Drachman DA (2014) The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, **10**, 372–380.
- Eadie BD, van Redila A, Christie BR (2005) Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *The Journal of comparative neurology*, **486**, 39–47.
- Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schüssel K, Müller WE (2003) Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*, **66**, 1627–1634.
- Eckert GP, Lipka U, Muller WE (2013) Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, **88**, 105–114.
- Eckert GP, Renner K, Eckert SH *et al.* (2012) Mitochondrial dysfunction--a pharmacological target in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, **46**, 136–150.
- Eckmann J, Eckert SH, Leuner K, Muller WE, Eckert GP (2013) Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **45**, 76–80.
- Escames G, Díaz-Casado ME, Doerrier C, Luna-Sánchez M, López LC, Acuña-Castroviejo D (2013) Early gender differences in the redox status of the brain mitochondria with age: effects of melatonin therapy. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, **16**, 91–100.
- Eylers VV, Maudsley AA, Bronzlik P, Dellani PR, Lanfermann H, Ding X-Q (2016) Detection of Normal Aging Effects on Human Brain Metabolite Concentrations and Microstructure with Whole-Brain MR Spectroscopic Imaging and Quantitative MR Imaging. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **37**, 447–454.
- Falco G de, Terlizzi M, Sirignano M, Commodo M, D'Anna A, Aquino RP, Pinto A, Sorrentino R (2017) Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from smokers release higher levels of IL-1-like cytokines after exposure to combustion-generated ultrafine particles. *Scientific reports*, **7**, 43016.

- Feldhaus P, Fraga DB, Ghedim FV *et al.* (2011) Evaluation of respiratory chain activity in lymphocytes of patients with Alzheimer disease. *Metabolic brain disease*, **26**, 229–236.
- Feng Z, Zhang J-t (2005) Long-term melatonin or 17beta-estradiol supplementation alleviates oxidative stress in ovariectomized adult rats. *Free radical biology & medicine*, **39**, 195–204.
- Ferguson KJ, MacLulich AM, Marshall I, Deary IJ, Starr JM, Seckl JR, Wardlaw JM (2002) Magnetic resonance spectroscopy and cognitive function in healthy elderly men. *Brain : a journal of neurology*, **125**, 2743–2749.
- Gaignard P, Savouroux S, Liere P, Pianos A, Thérond P, Schumacher M, Slama A, Guenoun R (2015) Effect of Sex Differences on Brain Mitochondrial Function and Its Suppression by Ovariectomy and in Aged Mice. *Endocrinology*, **156**, 2893–2904.
- Galano A (2011) On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, **13**, 7178–7188.
- Gallaway PJ, Miyake H, Buchowski MS, Shimada M, Yoshitake Y, Kim AS, Hongu N (2017) Physical Activity: A Viable Way to Reduce the Risks of Mild Cognitive Impairment, Alzheimer's Disease, and Vascular Dementia in Older Adults. *Brain Sciences*, **7**.
- García-Mesa Y, Giménez-Llort L, López LC, Venegas C, Cristòfol R, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Sanfeliu C (2012) Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiology of aging*, **33**, 1124.e13-29.
- Gardener S, Gu Y, Rainey-Smith SR *et al.* (2012) Adherence to a Mediterranean diet and Alzheimer's disease risk in an Australian population. *Translational psychiatry*, **2**, e164.
- Genin E, Hannequin D, Wallon D *et al.* (2011) APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Molecular psychiatry*, **16**, 903–907.
- Gibson GE, Shi Q (2010) A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multi-faceted treatments. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **20 Suppl 2**, S591-607.
- Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ *et al.* (2001) Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatric research*, **50**, 756–760.
- Goldhammer E, Tanchilevitch A, Maor I, Beniamini Y, Rosenschein U, Sagiv M (2005) Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. *International journal of cardiology*, **100**, 93–99.
- Goldstein FB (1959) Biosynthesis of N-acetyl-l-aspartic acid. *Biochimica et biophysica acta*, **33**, 583–584.
- Goods BA, Vahey JM, Steinschneider AF, Askenase MH, Sansing L, Christopher Love J (2018) Blood handling and leukocyte isolation methods impact the global transcriptome of immune cells. *BMC immunology*, **19**, 30.
- Goyal A, Terry PD, Superak HM, Nell-Dybdahl CL, Chowdhury R, Phillips LS, Kutner MH (2014) Melatonin supplementation to treat the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *Diabetology & metabolic syndrome*, **6**, 124.
- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science (New York, N.Y.)*, **283**, 1476–1481.

- Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, Malone KE (2016) Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and biobanking*, **14**, 410–415.
- Grimm A, Biliouris EE, Lang UE, Götz J, Mensah-Nyagan AG, Eckert A (2016a) Sex hormone-related neurosteroids differentially rescue bioenergetic deficits induced by amyloid- β or hyperphosphorylated tau protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **73**, 201–215.
- Grimm A, Mensah-Nyagan AG, Eckert A (2016b) Alzheimer, mitochondria and gender. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **67**, 89–101.
- Grimm MO, Kuchenbecker J, Grösgen S *et al.* (2011) Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 14028–14039.
- Grune T (2014) Alterungsprozesse und Neurodegeneration. Ein Überblick. Springer Spektrum, Wiesbaden, 39 pp.
- Gu Y, Brickman AM, Stern Y *et al.* (2015) Mediterranean diet and brain structure in a multi-ethnic elderly cohort. *Neurology*, **85**, 1744–1751.
- Guevara R, Gianotti M, Roca P, Oliver J (2011) Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial function. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, **27**, 201–206.
- Gunn PJ, Middleton B, Davies SK, Revell VL, Skene DJ (2016) Sex differences in the circadian profiles of melatonin and cortisol in plasma and urine matrices under constant routine conditions. *Chronobiology international*, **33**, 39–50.
- Haas RH (2019) Mitochondrial Dysfunction in Aging and Diseases of Aging. *Biology*, **8**.
- Hagl S, Asseburg H, Heinrich M, Sus N, Blumrich E-M, Dringen R, Frank J, Eckert GP (2016a) Effects of Long-Term Rice Bran Extract Supplementation on Survival, Cognition and Brain Mitochondrial Function in Aged NMRI Mice. *Neuromolecular medicine*, **18**, 347–363.
- Hagl S, Berressem D, Grewal R, Sus N, Frank J, Eckert GP (2016b) Rice bran extract improves mitochondrial dysfunction in brains of aged NMRI mice. *Nutritional neuroscience*, **19**, 1–10.
- Hagl S, Grewal R, Ciobanu I, Helal A, Khayyal MT, Muller WE, Eckert GP (2015) Rice bran extract compensates mitochondrial dysfunction in a cellular model of early Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **43**, 927–938.
- Hagl S, Heinrich M, Kocher A, Schiborr C, Frank J, Eckert GP (2014) Curcumin Micelles Improve Mitochondrial Function in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, **1**, 80–83.
- Hamer M, Chida Y (2009) Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychological medicine*, **39**, 3–11.
- Hanagasi HA, Ayribas D, Baysal K, Emre M (2005) Mitochondrial complex I, II/III, and IV activities in familial and sporadic Parkinson's disease. *The International journal of neuroscience*, **115**, 479–493.

- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, **256**, 184–185.
- Haring B, Wu C, Mossavar-Rahmani Y, Snetselaar L, Brunner R, Wallace RB, Neuhaus ML, Wassertheil-Smoller S (2016) No association between dietary patterns and risk for cognitive decline in older women with nine-year follow-up: data from the Women's Health Initiative Memory Study. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, **116**, 921-930.e1.
- Harish G, Venkateshappa C, Mahadevan A, Pruthi N, Bharath MM, Shankar SK (2013) Mitochondrial function in human brains is affected by pre- and post mortem factors. *Neuropathology and applied neurobiology*, **39**, 298–315.
- Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, **20**, 145–147.
- Harris WS, Ginsberg HN, Arunakul N, Shachter NS, Windsor SL, Adams M, Berglund L, Osmondson K (1997) Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia. *Journal of cardiovascular risk*, **4**, 385–391.
- Hauptmann S, Scherping I, Dröse S *et al.* (2009) Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiology of aging*, **30**, 1574–1586.
- Heales R, Davies SE, Bates TE, Clark JB (1995) Depletion of brain glutathione is accompanied by impaired mitochondrial function and decreased N-acetyl aspartate concentration. *Neurochemical Research*, **20**, 31–38.
- Herrup K (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature neuroscience*, **18**, 794–799.
- Herzig S, Long F, Jhala US *et al.* (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 179–183.
- Hsiao C-P, Hoppel C (2018) Analyzing mitochondrial function in human peripheral blood mononuclear cells. *Analytical biochemistry*, **549**, 12–20.
- Huang J, Wang X, Zhu Y *et al.* (2019) Exercise activates lysosomal function in the brain through AMPK-SIRT1-TFEB pathway. *CNS neuroscience & therapeutics*, **25**, 796–807.
- Huang TL, Zandi PP, Tucker KL, Fitzpatrick AL, Kuller LH, Fried LP, Burke GL, Carlson MC (2005) Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology*, **65**, 1409–1414.
- Huh JY (2018) The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Archives of pharmacal research*, **41**, 14–29.
- Irwin RW, Yao J, Ahmed SS, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD (2010) Medroxyprogesterone Acetate Antagonizes Estrogen Up-Regulation of Brain Mitochondrial Function. *Endocrinology*, **152**, 556–567.
- Ittner LM, Götz J (2011) Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, **12**, 65–72.
- Jack CR, Bennett DA, Blennow K *et al.* (2018) NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, **14**, 535–562.

- Jackson KH, Polreis JM, Tintle NL, Kris-Etherton PM, Harris WS (2019) Association of reported fish intake and supplementation status with the omega-3 index. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, **142**, 4–10.
- Japiassú AM, Santiago AP, d'Avila Jd, Garcia-Souza LF, Galina A, Castro Faria-Neto HC, Bozza FA, Oliveira MF (2011) Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity. *Critical care medicine*, **39**, 1056–1063.
- Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM (1997) Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Annals of Neurology*, **42**, 776–782.
- Kantarci K, Weigand SD, Przybelski SA *et al.* (2009) Risk of dementia in MCI: combined effect of cerebrovascular disease, volumetric MRI, and 1H MRS. *Neurology*, **72**, 1519–1525.
- Karr S (2017) Epidemiology and management of hyperlipidemia. *The American journal of managed care*, **23**, S139-S148.
- Kastorini C-M, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB (2011) The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *Journal of the American College of Cardiology*, **57**, 1299–1313.
- Keil U, Bonert A, Marques CA *et al.* (2004) Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 50310–50320.
- Keil U, Hauptmann S, Bonert A, Scherping I, Eckert A, Müller WE (2006) Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant A β PP and tau protein mutations. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **9**, 139–146.
- Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y (1997) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Advances in experimental medicine and biology*, **400B**, 589–597.
- Khalifa AR, Abdel-Rahman EA, Mahmoud AM, Ali MH, Noureldin M, Saber SH, Mohsen M, Ali SS (2017) Sex-specific differences in mitochondria biogenesis, morphology, respiratory function, and ROS homeostasis in young mouse heart and brain. *Physiological reports*, **5**.
- Kim YS, Lee KJ, Kim H (2017) Serum tumour necrosis factor- α and interleukin-6 levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society*, **17**, 224–230.
- Kirchner L, Chen W-Q, Afjehi-Sadat L, Viidik A, Skalicky M, Höger H, Lubec G (2008) Hippocampal metabolic proteins are modulated in voluntary and treadmill exercise rats. *Experimental neurology*, **212**, 145–151.
- Kitajka K, Puskás LG, Zvara A, Hackler L, Barceló-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T (2002) The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 2619–2624.
- Kleiveland CR (2015) The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. Peripheral Blood Mononuclear Cells, Cham (CH).

- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England journal of medicine*, **346**, 393–403.
- Köhler A, Bittner D, Löw A, Schacky C von (2010) Effects of a convenience drink fortified with n-3 fatty acids on the n-3 index. *The British journal of nutrition*, **104**, 729–736.
- Kotler M, Rodríguez C, Sáinz RM, Antolin I, Menéndez-Peláez A (1998) Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *Journal of pineal research*, **24**, 83–89.
- Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-Usmar VM (2014) A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox biology*, **2**, 206–210.
- Kurokawa T, Asada S, Nishitani S, Hazeki O (2001) Age-related changes in manganese superoxide dismutase activity in the cerebral cortex of senescence-accelerated prone and resistant mouse. *Neuroscience letters*, **298**, 135–138.
- La Torre JC de (2002) Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **977**, 196–215.
- Laitinen MH, Ngandu T, Rovio S *et al.* (2006) Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based study. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, **22**, 99–107.
- Lane RK, Hilsabeck T, Rea SL (2015) The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. *Biochimica et biophysica acta*, **1847**, 1387–1400.
- Larsen S, Nielsen J, Hansen CN *et al.* (2012) Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of physiology*, **590**, 3349–3360.
- Lautenschlager NT, Cox KL (2013) Can participation in mental and physical activity protect cognition in old age?: Comment on "The Mental Activity and eXercise (MAX) trial: a randomized controlled trial to enhance cognitive function in older adults". *JAMA internal medicine*, **173**, 805–806.
- Lavebratt C, Herring MP, Liu JJ, Wei YB, Bossoli D, Hallgren M, Forsell Y (2017) Interleukin-6 and depressive symptom severity in response to physical exercise. *Psychiatry research*, **252**, 270–276.
- Lee J-H, Moon J-H, Nazim UM, Lee Y-J, Seol J-W, Eo S-K, Lee J-H, Park S-Y (2016) Melatonin protects skin keratinocyte from hydrogen peroxide-mediated cell death via the SIRT1 pathway. *Oncotarget*, **7**, 12075–12088.
- Leem Y-H, Lim H-J, Shim S-B, Cho J-Y, Kim B-S, Han P-L (2009) Repression of tau hyperphosphorylation by chronic endurance exercise in aged transgenic mouse model of tauopathies. *Journal of neuroscience research*, **87**, 2561–2570.
- Lejri I, Grimm A, Eckert A (2018) Mitochondria, Estrogen and Female Brain Aging. *Frontiers in aging neuroscience*, **10**, 124.
- Lejri I, Grimm A, Miesch M, Geoffroy P, Eckert A, Mensah-Nyagan A-G (2017) Allopregnanolone and its analog BR 297 rescue neuronal cells from oxidative stress-induced death through bioenergetic improvement. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, **1863**, 631–642.

- Lenn J, Uhl T, Mattacola C, Boissonneault G, Yates J, Ibrahim W, Bruckner G (2002) The effects of fish oil and isoflavones on delayed onset muscle soreness. *Medicine and science in sports and exercise*, **34**, 1605–1613.
- Leuner K, Pantel J, Frey C *et al.* (2007) Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease. In: *Neuropsychiatric disorders. An integrative approach* (eds Gerlach M, Deckert J, Double K, Koutsilieri E), pp 207–215. SPRINGER, Wien, New York.
- Leuner K, Schulz K, Schütt T *et al.* (2012) Peripheral mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: focus on lymphocytes. *Molecular neurobiology*, **46**, 194–204.
- Leutz S, Steiner B, Marques CA, Haass C, Muller WE (2002) Reduction of Trophic Support Enhances Apoptosis in PC12 Cells Expressing Alzheimer's APP Mutation and Sensitizes Cells to Staurosporine-Induced Cell Death. *Journal of Molecular Neuroscience*, **18**, 189–202.
- Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, Casadei V, Grimaldi LM (2000) Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *Journal of neuroimmunology*, **103**, 97–102.
- Lim GP, Calon F, Morihara T *et al.* (2005) A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 3032–3040.
- Lin MT, Simon DK, Ahn CH, Kim LM, Beal MF (2002) High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Human molecular genetics*, **11**, 133–145.
- Liu F, Ng TB (2000) Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, **78**, 447–453.
- Lonergan PE, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA (2002) Neuroprotective effect of eicosa-pentaenoic acid in hippocampus of rats exposed to gamma-irradiation. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 20804–20811.
- Lonergan PE, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA (2004) Neuroprotective actions of eicosa-pentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced dysfunction in rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, **91**, 20–29.
- López-González A, Álvarez-Sánchez N, Lardone PJ, Cruz-Chamorro I, Martínez-López A, Guerrero JM, Reiter RJ, Carrillo-Vico A (2015) Melatonin treatment improves primary progressive multiple sclerosis: a case report. *Journal of pineal research*, **58**, 173–177.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, **153**, 1194–1217.
- Loughrey DG, Lavecchia S, Brennan S, Lawlor BA, Kelly ME (2017) The Impact of the Mediterranean Diet on the Cognitive Functioning of Healthy Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, **8**, 571–586.
- Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF (2013) Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce

- biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, **110**, 472–480.
- Luciano M, Corley J, Cox SR *et al.* (2017) Mediterranean-type diet and brain structural change from 73 to 76 years in a Scottish cohort. *Neurology*, **88**, 449–455.
- Madreiter-Sokolowski CT, Sokolowski AA, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2018) Targeting Mitochondria to Counteract Age-Related Cellular Dysfunction. *Genes*, **9**.
- Mancuso M, Filosto M, Bosetti F *et al.* (2003) Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. *Experimental neurology*, **182**, 421–426.
- Manczak M, Park BS, Jung Y, Reddy PH (2004) Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromolecular medicine*, **5**, 147–162.
- Mandal PK, Tripathi M, Sugunan S (2012) Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. *Biochemical and biophysical research communications*, **417**, 43–48.
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, Chen G (2012) Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, **13**, 293–307.
- Manzanares W, Langlois PL, Hardy G (2016) Intravenous lipid emulsions in the critically ill: an update. *Current opinion in critical care*, **22**, 308–315.
- Marinus N, Hansen D, Feys P, Meesen R, Timmermans A, Spildooren J (2019) The Impact of Different Types of Exercise Training on Peripheral Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentrations in Older Adults: A Meta-Analysis. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*.
- Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balça MM, Rizo-Roca D, Moreira PI, Oliveira PJ, Magalhães J, Ascensão A (2015a) Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto(mito)phagy markers. *Neuroscience*, **301**, 480–495.
- Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Mariani D *et al.* (2015b) Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion*, **20**, 22–33.
- Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D (2000) Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *Journal of pineal research*, **28**, 242–248.
- Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D (2002) Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **34**, 348–357.
- Martínez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E *et al.* (2013) Virgin olive oil supplementation and long-term cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomized, trial. *The journal of nutrition, health & aging*, **17**, 544–552.

- Matthews DC, Davies M, Murray J *et al.* (2014) Physical Activity, Mediterranean Diet and Biomarkers-Assessed Risk of Alzheimer's: A Multi-Modality Brain Imaging Study. *Advances in molecular imaging*, **4**, 43–57.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing research reviews*, **3**, 445–464.
- Maudsley AA, Domenig C, Govind V, Darkazanli A, Studholme C, Arheart K, Bloomer C (2009) Mapping of brain metabolite distributions by volumetric proton MR spectroscopic imaging (MRSI). *Magnetic resonance in medicine*, **61**, 548–559.
- Mayeux R, Small SA, Tang M, Tycko B, Stern Y (2001) Memory performance in healthy elderly without Alzheimer's disease: effects of time and apolipoprotein-E. *Neurobiology of aging*, **22**, 683–689.
- Maynard S, Hejl A-M, Dinh T-ST *et al.* (2015) Defective mitochondrial respiration, altered dNTP pools and reduced AP endonuclease 1 activity in peripheral blood mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. *Aging*, **7**, 793–815.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C (2002) Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 1706–1713.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **2**, 599–609.
- Melov S (2000) Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **908**, 219–225.
- Melov S, Adlard PA, Morten K *et al.* (2007) Mitochondrial Oxidative Stress Causes Hyperphosphorylation of Tau. *PLoS ONE*, **2**.
- Middleton LE, Yaffe K (2010) Targets for the prevention of dementia. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **20**, 915–924.
- Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L (2005) Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of aging*, **26**, 587–595.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Experimental gerontology*, **15**, 575–591.
- Mirochnic S, Wolf S, Staufenbiel M, Kempermann G (2009) Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*, **19**, 1008–1018.
- Mitchell AJ, Shiri-Feshki M (2009) Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia--meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta psychiatrica Scandinavica*, **119**, 252–265.
- Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri MA (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: From Neurodiagnostics to Neurobiology. *Progress in neurobiology*, **81**, 89–131.
- Molfino A, Amabile MI, Monti M, Muscaritoli M (2017) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both? *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**, 5987082.

- Montgomery MK, Turner N (2015) Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine connections*, **4**, R1-R15.
- Mori N, Mook-Jung I (2016) AGING MECHANISMS. Longevity, metabolism, and brain aging. SPRINGER, [S.I.].
- Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN, Best JD, Beilin LJ (2000) Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *The American journal of clinical nutrition*, **71**, 1085–1094.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J (2003) Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology*, **60**, 940–946.
- Mosconi L, Pupi A, Leon MJ de (2008) Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1147**, 180–195.
- Murphy E, Steenbergen C (2007) Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research*, **75**, 478–486.
- Murphy K, Weaver C (2018) Janeway Immunologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Nagamatsu LS, Handy TC, Hsu CL, Voss M, Liu-Ambrose T (2012) Resistance training promotes cognitive and functional brain plasticity in seniors with probable mild cognitive impairment: A 6-month randomized controlled trial. *Archives of internal medicine*, **172**, 666–668.
- Navarro A, Boveris A (2004) Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **287**, R1244-9.
- Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A *et al.* (2015) A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *The Lancet*, **385**, 2255–2263.
- Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, Jin F, Maxwell KR (2009) n-3 polyunsaturated fatty acids do not alter immune and inflammation measures in endurance athletes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, **19**, 536–546.
- Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I (2017) Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología (Barcelona, Spain)*, **32**, 523–532.
- Oboudiyat C, Glazer H, Seifan A, Greer C, Isaacson RS (2013) Alzheimer's disease. *Seminars in neurology*, **33**, 313–329.
- Ojaimi J, Masters CL, McLean C, Opeskin K, McKelvie P, Byrne E (1999) Irregular distribution of cytochrome oxidase protein subunits in aging and Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, **46**, 656–660.
- Olsson E, Karlström B, Kilander L, Byberg L, Cederholm T, Sjögren P (2015) Dietary patterns and cognitive dysfunction in a 12-year follow-up study of 70 year old men. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **43**, 109–119.

- Ostan R, Monti D, Guerresi P, Bussolotto M, Franceschi C, Baggio G (2016) Gender, aging and longevity in humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine. *Clinical science (London, England : 1979)*, **130**, 1711–1725.
- Ozturk G, Coşkun S, Erbaş D, Hasanoglu E (2000) The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *The Japanese journal of physiology*, **50**, 149–153.
- Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E (1998) Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochemistry international*, **32**, 69–75.
- Padro T, Vilahur G, Sánchez-Hernández J, Hernández M, Antonijoan RM, Perez A, Badimon L (2015) Lipidomic changes of LDL in overweight and moderately hypercholesterolemic subjects taking phytosterol- and omega-3-supplemented milk. *Journal of lipid research*, **56**, 1043–1056.
- Pani A, Mandas A, Diaz G *et al.* (2009) Accumulation of neutral lipids in peripheral blood mononuclear cells as a distinctive trait of Alzheimer patients and asymptomatic subjects at risk of disease. *BMC medicine*, **7**, 66.
- Papa S (1996) Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1276**, 87–105.
- Pareja-Galeano H, Brioche T, Sanchis-Gomar F, Montal A, Jovaní C, Martínez-Costa C, Gomez-Cabrera MC, Viña J (2013) Impact of exercise training on neuroplasticity-related growth factors in adolescents. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, **13**, 368–371.
- Park DC, Reuter-Lorenz P (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annual review of psychology*, **60**, 173–196.
- Parker WD, Filley CM, Parks JK (1990) Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology*, **40**, 1302–1303.
- Parker WD, Parks JK (1995) Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization. *Neurology*, **45**, 482–486.
- Paslakis G, Träber F, Roberz J, Block W, Jessen F (2014) N-acetyl-aspartate (NAA) as a correlate of pharmacological treatment in psychiatric disorders: a systematic review. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **24**, 1659–1675.
- Patki G, Lau Y-S (2011) Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **99**, 704–711.
- Pedersen BK (2017) Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *European journal of clinical investigation*, **47**, 600–611.
- Perez SE, Berg BM, Moore KA *et al.* (2010) DHA diet reduces AD pathology in young APP^{swe}/PS1^{Delta E9} transgenic mice: possible gender effects. *Journal of neuroscience research*, **88**, 1026–1040.
- Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **98**, 1154–1162.

- Phillips T, Childs AC, Dreon DM, Phinney S, Leeuwenburgh C (2003) A dietary supplement attenuates IL-6 and CRP after eccentric exercise in untrained males. *Medicine and science in sports and exercise*, **35**, 2032–2037.
- Phillipson BE, Rothrock DW, Connor WE, Harris WS, Illingworth DR (1985) Reduction of plasma lipids, lipoproteins, and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *The New England journal of medicine*, **312**, 1210–1216.
- Pike KE, Savage G, Villemagne VL *et al.* (2007) Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 2837–2844.
- Pilatus U, Lais C, Du Rochmont AM de *et al.* (2009) Conversion to dementia in mild cognitive impairment is associated with decline of N-acetylaspartate and creatine as revealed by magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry research*, **173**, 1–7.
- Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali G-C, Wu Y-T, Prina M (2015) World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia | Alzheimer's Disease International. Available via <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>. Accessed 12 Aug 2019.
- Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I (2010) Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **20**, 777–783.
- Radak Z, Marton O, Nagy E, Koltai E, Goto S (2013) The complex role of physical exercise and reactive oxygen species on brain. *Journal of Sport and Health Science*, **2**, 87–93. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S209525461300029X>.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S (2001) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise immunology review*, **7**, 90–107.
- Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2007) Estrogen Suppresses Brain Mitochondrial Oxidative Stress in Female and Male Rats. *Brain research*, **1176**, 71–81.
- Rebok GW, Ball K, Guey LT *et al.* (2014) Ten-Year Effects of the ACTIVE Cognitive Training Trial on Cognition and Everyday Functioning in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, **62**, 16–24.
- Reddy PH, McWeeney S, Park BS *et al.* (2004) Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, **13**, 1225–1240.
- Reddy PH, Yin X, Manczak M, Kumar S, Pradeepkiran JA, Vijayan M, Reddy AP (2018) Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, **27**, 2502–2516.
- Rees K, Hartley L, Flowers N, Clarke A, Hooper L, Thorogood M, Stranges S (2013) 'Mediterranean' dietary pattern for the primary prevention of cardiovascular disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD009825.
- Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, Saunders AM, Hardy J (2004) Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 284–289.

- Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S (2001) Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **939**, 200–215.
- Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B (2017) Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **74**, 3863–3881.
- Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B (2018) Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **23**.
- Reiter RJ, Tan D-X, Rosales-Corral S, Manchester LC (2013) The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **13**, 373–384.
- Rera M, Clark RI, Walker DW (2012) Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 21528–21533.
- Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C (2003) Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 3295–3301.
- Reutzel M, Grewal R, Silaidos C, Zotzel J, Marx S, Tretzel J, Eckert GP (2018) Effects of Long-Term Treatment with a Blend of Highly Purified Olive Secoiridoids on Cognition and Brain ATP Levels in Aged NMRI Mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2018**, 4070935.
- Rhein V, Giese M, Baysang G, Meier F, Rao S, Schulz KL, Hamburger M, Eckert A (2010) Ginkgo biloba extract ameliorates oxidative phosphorylation performance and rescues abeta-induced failure. *PLoS ONE*, **5**, e12359.
- Rhein V, Song X, Wiesner A *et al.* (2009) Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20057–20062.
- Rijpmma A, van der Graaf M, Lansbergen MM, Meulenbroek O, Cetinyurek-Yavuz A, Sijben JW, Heerschap A, Olde Rikkert MG (2017) The medical food Souvenaid affects brain phospholipid metabolism in mild Alzheimer's disease: results from a randomized controlled trial. *Alzheimer's research & therapy*, **9**, 51.
- Rink L, Kruse A, Haase H (2015) Immunologie für Einsteiger. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Roberts R, Knopman DS (2013) Classification and epidemiology of MCI. *Clinics in geriatric medicine*, **29**, 753–772.
- Rocha DM, Bressan J, Hermsdorff HH (2017) The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*, **135**, 157–168.
- Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mrosovsky M (2003) Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of biological rhythms*, **18**, 80–90.
- Rohrbach S (2009) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Current pharmaceutical design*, **15**, 4103–4116.

- Rosenberg PB (2005) Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. *International review of psychiatry (Abingdon, England)*, **17**, 503–514.
- Ross AJ, Sachdev PS (2004) Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research. *Brain research. Brain research reviews*, **44**, 83–102.
- Rossi S, Zanier ER, Mauri I, Columbo A, Stocchetti N (2001) Brain temperature, body core temperature, and intracranial pressure in acute cerebral damage. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **71**, 448–454.
- Rovio S, Spulber G, Nieminen LJ *et al.* (2010) The effect of midlife physical activity on structural brain changes in the elderly. *Neurobiology of aging*, **31**, 1927–1936.
- Ruszkiewicz JA, Miranda-Vizuete A, Tinkov AA, Skalnaya MG, Skalny AV, Tsatsakis A, Aschner M (2019) Sex-Specific Differences in Redox Homeostasis in Brain Norm and Disease. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **67**, 312–342.
- Rutkai I, Dutta S, Katakam PV, Busija DW (2015) Dynamics of enhanced mitochondrial respiration in female compared with male rat cerebral arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **309**, H1490-500.
- Samieri C, Morris M-C, Bennett DA *et al.* (2018) Fish Intake, Genetic Predisposition to Alzheimer Disease, and Decline in Global Cognition and Memory in 5 Cohorts of Older Persons. *American journal of epidemiology*, **187**, 933–940.
- Sanchez-Muniz FJ, Bastida S, Viejo JM, Terpstra AH (1999) Small supplements of N-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholipid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *European journal of nutrition*, **38**, 20–27.
- Sandhir R, Sethi N, Aggarwal A, Khera A (2014) Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause. *Neurochemistry international*, **74**, 16–23.
- Santhi N, Lazar AS, McCabe PJ, Lo JC, Groeger JA, Dijk D-J (2016) Sex differences in the circadian regulation of sleep and waking cognition in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E2730-9.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D *et al.* (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, **43**, 1467–1472.
- Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC (2003) A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Archives of neurology*, **60**, 989–994.
- Scarmeas N, Stern Y, Tang M-X, Mayeux R, Luchsinger JA (2006) Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, **59**, 912–921.
- Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews*, **88**, 611–638.
- Schacky C von, Kemper M, Haslbauer R, Halle M (2014) Low Omega-3 Index in 106 German elite winter endurance athletes: a pilot study. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, **24**, 559–564.

- Schaefers AT, Teuchert-Noodt G (2016) Developmental neuroplasticity and the origin of neurodegenerative diseases. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, **17**, 587–599.
- Scheer FA, Morris CJ, Garcia JI, Smales C, Kelly EE, Marks J, Malhotra A, Shea SA (2012) Repeated melatonin supplementation improves sleep in hypertensive patients treated with beta-blockers: a randomized controlled trial. *Sleep*, **35**, 1395–1402.
- Scheffler IE (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*, **1**, 3–31.
- Scheltens P, Kamphuis PJ, Verhey FR, Olde Rikkert MG, Wurtman RJ, Wilkinson D, Twisk JW, Kurz A (2010) Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, **6**, 1–10.e1.
- Scheltens P, Twisk JW, Blesa R *et al.* (2012) Efficacy of Souvenaid in mild Alzheimer's disease: results from a randomized, controlled trial. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **31**, 225–236.
- Schindler SE, Bollinger JG, Ovod V *et al.* (2019) High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology*.
- Schindowski K, Kratzsch T, Peters J *et al.* (2003) Impact of Aging: Sporadic, and Genetic Risk Factors on Vulnerability to Apoptosis in Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Medicine*, **4**, 161–178.
- Schmitz B, Wang X, Barker PB *et al.* (2018) Effects of Aging on the Human Brain: A Proton and Phosphorus MR Spectroscopy Study at 3T. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*, **28**, 416–421.
- Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA (2007) Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*, **69**, 2197–2204.
- Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Bennett DA (2009) The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Annals of neurology*, **66**, 200–208.
- Schuessel K, Leutner S, Cairns NJ, Müller WE, Eckert A (2004) Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, **111**, 1167–1182.
- Schuessel K, Schäfer S, Bayer TA, Czech C, Pradier L, Müller-Spahn F, Müller WE, Eckert A (2005) Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. *Neurobiology of disease*, **18**, 89–99.
- Schumacher A, Peersen K, Sommervoll L, Seljeflot I, Arnesen H, Otterstad JE (2006) Physical performance is associated with markers of vascular inflammation in patients with coronary heart disease. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, **13**, 356–362.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, **8**, 595–608.
- Sharafati-Chaleshtori R, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M, Soltani A (2017) Melatonin and human mitochondrial diseases. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, **22**.

- Shechter A, Lespérance P, Ng Ying Kin NM, Boivin DB (2012) Nocturnal polysomnographic sleep across the menstrual cycle in premenstrual dysphoric disorder. *Sleep medicine*, **13**, 1071–1078.
- Shi C, Guo K, Yew DT, Yao Z, Forster EL, Wang H, Xu J (2008) Effects of ageing and Alzheimer's disease on mitochondrial function of human platelets. *Experimental gerontology*, **43**, 589–594.
- Shi C, Xiao S, Liu J, Guo K, Wu F, Yew DT, Xu J (2010) Ginkgo biloba extract EGb761 protects against aging-associated mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of SAMP8 mice. *Platelets*, **21**, 373–379.
- Sibbitt WL, Haseler LJ, Griffey RR, Friedman SD, Brooks WM (1997) Neurometabolism of active neuropsychiatric lupus determined with proton MR spectroscopy. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **18**, 1271–1277.
- Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Dunbar J, Amorini AM, Lazzarino G, Vagnozzi R (2004) The protective effect of cyclosporin A upon N-acetylaspartate and mitochondrial dysfunction following experimental diffuse traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, **21**, 1154–1167.
- Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Lazzarino G, Beaumont A, Vagnozzi R (2001) N-Acetylaspartate reduction as a measure of injury severity and mitochondrial dysfunction following diffuse traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, **18**, 977–991.
- Silaidos C, Grube J, Muley C, Eckert GP (2020) Time dependent melatonin secretion is associated with mitochondrial function in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of male volunteers. *Mitochondrion*. In press.
- Silaidos C, Pilatus U, Grewal R, Matura S, Lienerth B, Pantel J, Eckert GP (2018) Sex-associated differences in mitochondrial function in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and brain. *Biology of sex differences*, **9**, 34.
- Silva DF, Selfridge JE, Lu J, E L, Cardoso SM, Swerdlow RH (2012) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease: possible targets for therapeutic intervention. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, **64**, 83–126.
- Singh B, Parsaik AK, Mielke MM, Erwin PJ, Knopman DS, Petersen RC, Roberts RO (2014) Association of mediterranean diet with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **39**, 271–282.
- Smiljanic K, Mladenovic A, Todorovic S, Kanazir S (2017) The aging brain - molecular and metabolic changes. *Biologia Serbica*, **39**, 26–31.
- Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A (2014) Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. *Public health nutrition*, **17**, 2769–2782.
- Sofi F, Valecchi D, Bacci D, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Macchi C (2011) Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Journal of internal medicine*, **269**, 107–117.
- Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM (2011) Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **111**, 1066–1071.

- Stephen R, Hongisto K, Solomon A, Lönnroos E (2017) Physical Activity and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, **72**, 733–739.
- Supnet C, Bezprozvanny I (2010) The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell calcium*, **47**, 183–189.
- Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B (1997) Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta neuropathologica*, **94**, 345–352.
- Swaminathan A, Jicha GA (2014) Nutrition and prevention of Alzheimer's dementia. *Frontiers in aging neuroscience*, **6**, 282.
- Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM (2014) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochimica et biophysica acta*, **1842**, 1219–1231.
- Swerdlow RH, Khan SM (2004) A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*, **63**, 8–20.
- Tartibian B, Maleki BH, Abbasi A (2011) Omega-3 fatty acids supplementation attenuates inflammatory markers after eccentric exercise in untrained men. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*, **21**, 131–137.
- Teunissen CE, Vente J de, Steinbusch HW, Buijn C de (2002) Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiology of aging*, **23**, 485–508.
- Thomas TR, Smith BK, Donahue OM, Altena TS, James-Kracke M, Sun GY (2004) Effects of omega-3 fatty acid supplementation and exercise on low-density lipoprotein and high-density lipoprotein subfractions. *Metabolism: clinical and experimental*, **53**, 749–754.
- Toft AD, Thorn M, Ostrowski K *et al.* (2000) N-3 polyunsaturated fatty acids do not affect cytokine response to strenuous exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **89**, 2401–2406.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A, Martinez-Fraga J, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D (2003) Effects of continuous light exposure on antioxidant enzymes, porphyrin enzymes and cellular damage in the Harderian gland of the Syrian hamster. *Journal of pineal research*, **34**, 60–68.
- Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C (2017) Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current neuropharmacology*, **15**, 434–443.
- Tower J (2006) Sex-specific regulation of aging and apoptosis. *Mechanisms of ageing and development*, **127**, 705–718.
- Trounce I, Byrne E, Marzuki S (1989) DECLINE IN SKELETAL MUSCLE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN FUNCTION: POSSIBLE FACTOR IN AGEING. *The Lancet*, **333**, 637–639.
- Truckenmiller ME, Nambodiri MA, Brownstein MJ, Neale JH (1985) N-Acetylation of L-aspartate in the nervous system: differential distribution of a specific enzyme. *Journal of neurochemistry*, **45**, 1658–1662.
- Tsai G, Coyle JT (1995) N-acetylaspartate in neuropsychiatric disorders. *Progress in neurobiology*, **46**, 531–540.

- Tsivgoulis G, Judd S, Letter AJ *et al.* (2013) Adherence to a Mediterranean diet and risk of incident cognitive impairment. *Neurology*, **80**, 1684–1692.
- Tunc-Ata M, Turgut G, Mergen-Dalyanoglu M, Turgut S (2017) Examination of levels pentraxin-3, interleukin-6, and C-reactive protein in rat model acute and chronic exercise. *Journal of exercise rehabilitation*, **13**, 279–283.
- Túnez I, del Carmen Muñoz M, Feijoo M, Valdelvira ME, Rafael Muñoz-Castañeda J, Montilla P (2003) Melatonin effect on renal oxidative stress under constant light exposure. *Cell biochemistry and function*, **21**, 35–40.
- Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG *et al.* (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England journal of medicine*, **344**, 1343–1350.
- Tyrovolas S, Haro JM, Mariolis A *et al.* (2014) Successful aging, dietary habits and health status of elderly individuals: a k-dimensional approach within the multi-national MEDIS study. *Experimental gerontology*, **60**, 57–63.
- Um H-S, Kang E-B, Koo J-H *et al.* (2011) Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience research*, **69**, 161–173.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T (1999) Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free radical biology & medicine*, **27**, 838–847.
- Vagnozzi R, Tavazzi B, Signoretti S *et al.* (2007) Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions: mitochondrial-related impairment—part I. *Neurosurgery*, **61**, 379-88; discussion 388-9.
- Valla J, Schneider L, Niedzielko T *et al.* (2006) Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Mitochondrion*, **6**, 323–330.
- Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M *et al.* (2015) Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA internal medicine*, **175**, 1094–1103.
- van Charante EP, Richard E, Eurelings LS *et al.* (2016) Effectiveness of a 6-year multidomain vascular care intervention to prevent dementia (preDIVA): a cluster-randomised controlled trial. *The Lancet*, **388**, 797–805.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 13427–13431.
- Vega JN, Newhouse PA (2014) Mild cognitive impairment: diagnosis, longitudinal course, and emerging treatments. *Current psychiatry reports*, **16**, 490.
- Velarde MC (2014) Mitochondrial and sex steroid hormone crosstalk during aging. *Longevity & healthspan*, **3**, 2.
- Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK (2012) Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, **37**, 1601–1614.

- Ventura-Clapier R, Moulin M, Piquereau J, Lemaire C, Mericskay M, Veksler V, Garnier A (2017) Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clinical science (London, England : 1979)*, **131**, 803–822.
- Viña J, Borrás C (2010) Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to intervene by using estrogenic compounds. *Antioxidants & redox signaling*, **13**, 269–278.
- Viña J, Sastre J, Pallardó FV, Gambini J, Borrás C (2008) Modulation of longevity-associated genes by estrogens or phytoestrogens. *Biological chemistry*, **389**, 273–277.
- Wang L, Feng C, Zheng X, Guo Y, Zhou F, Shan D, Liu X, Kong J (2017) Plant mitochondria synthesize melatonin and enhance the tolerance of plants to drought stress. *Journal of pineal research*, **63**.
- Wang Y, Xu E, Musich PR, Lin F (2019) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS neuroscience & therapeutics*, **25**, 816–824.
- Ward A, Tardiff S, Dye C, Arrighi HM (2013) Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra*, **3**, 320–332.
- Weidling I, Swerdlow RH (2019) Mitochondrial Dysfunction and Stress Responses in Alzheimer's Disease. *Biology*, **8**.
- Wetterberg L (1978) Melatonin in humans physiological and clinical studies. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 289–310.
- Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM *et al.* (2010) Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, **156**, 15–25.
- Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D (1995) Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American journal of clinical nutrition*, **61**, 1402S-1406S.
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S *et al.* (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet Neurology*, **15**, 455–532.
- World Health Organization (2011) Waist circumference and waist-hip ratio. Report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008. World Health Organization, Geneva, 39 pp.
- World Health Organization (2015) World report on ageing and health 2015. Available via <https://www.who.int/ageing/events/world-report-2015-launch/en/>. Accessed 12 Aug 2019.
- World Health Organization (2019) Risk reduction of cognitive decline and dementia. *WHO guidelines*.
- Wortmann M (2015) World Alzheimer report 2014. dementia and risk reduction. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, **11**, 837.
- Wu CC, Chiao CW, Hsiao G, Chen A, Yen MH (2001) Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *Journal of pineal research*, **30**, 147–156.
- Wu L, Sun D (2017) Adherence to Mediterranean diet and risk of developing cognitive disorders: An updated systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Scientific reports*, **7**.

- Wurtman RJ, Lieberman HR (1985) Melatonin secretion as a mediator of circadian variations in sleep and sleepiness. *Journal of pineal research*, **2**, 301–303.
- Xu J, Shi C, Li Q, Wu J, Forster EL, Yew DT (2007) Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **39**, 195–202.
- Xyda S-E, Vuckovic I, Petterson X-M, Dasari S, Lalia AZ, Parvizi M, Macura SI, Lanza IR (2019) Distinct influence of omega-3 fatty acids on the plasma metabolome of healthy older adults. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*.
- Yao J, Irwin R, Chen S, Hamilton R, Cadenas E, Brinton RD (2011) Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial β -amyloid. *Neurobiology of aging*, **33**, 1507–1521.
- Yassine HN, Braskie MN, Mack WJ, Castor KJ, Fonteh AN, Schneider LS, Harrington MG, Chui HC (2017) Association of Docosahexaenoic Acid Supplementation With Alzheimer Disease Stage in Apolipoprotein E ϵ 4 Carriers: A Review. *JAMA neurology*, **74**, 339–347.
- Yen T-C, Chen Y-S, King K-L, Yeh S-H, Wei Y-H (1989) Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochemical and biophysical research communications*, **165**, 994–1003.
- Yin F, Boveris A, Cadenas E (2014) Mitochondrial energy metabolism and redox signaling in brain aging and neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, **20**, 353–371.
- Zhang L, Trushin S, Christensen TA *et al.* (2016a) Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease. *Scientific reports*, **6**, 18725.
- Zhang Y, Chen J, Qiu J, Li Y, Wang J, Jiao J (2016b) Intakes of fish and polyunsaturated fatty acids and mild-to-severe cognitive impairment risks: a dose-response meta-analysis of 21 cohort studies. *The American journal of clinical nutrition*, **103**, 330–340.
- Zhao D, Yu Y, Shen Y, Liu Q, Zhao Z, Sharma R, Reiter RJ (2019) Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Frontiers in endocrinology*, **10**, 249.
- Zharikov S, Shiva S (2013) Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society transactions*, **41**, 118–123.
- Zhu Y, Liu X, Ding X, Wang F, Geng X (2019) Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*, **20**, 1–16.

Anhang

Tabelle A1 Hämatologie MIND AD_{mini}-Studie.

	Visit 1						Visit 2					
	Männer n = 8			Frauen n = 15			Männer n = 8			Frauen n = 13		
	Ko n = 2	Ls n = 2	L&F n = 4	Ko n = 5	Ls n = 6	L&F n = 4	Ko n = 2	Ls n = 2	L&F n = 4	Ko n = 5	Ls n = 4	L&F n = 4
Gewicht [kg]	NA	79,2±4,15	95,8±7,65	NA	72,8±8,97	65,5±5,42	NA	83,15±7,65	100,5±8,49	NA	75,40±10,04	67,45±5,70
BMI [kg/m²]	NA	23,94±0,94	29,83±1,87	NA	29,04±2,68	24,98±2,45	NA	25,47±2,5	31,47±2,37	NA	28,47±2,37	25,63±2,5
WHR	NA	0,98±0,05	1,04±0,04	NA	0,91±0,06	0,84±0,05	NA	1,01±0,02	1,07±0,04	NA	0,91±0,05	0,85±0,04
WBC [x10³/µl]	5,6±0,65	5±0,90	6,75±0,41	6,84±1,05	6,58±0,55	5,78±0,91	6,15±0,65	5,85±1,35	6,68±0,40	6,6±1,03	5,78±0,59	5,95±1,80
RBC [x10⁶/µl]	5,3±0,56	5,27±0,17	5,085±0,27	4,35±0,09	4,11±0,11	4,49±0,18	5,46±0,65	5,01±0,30	5,19±0,28	4,40±0,15	4,21±0,11	4,578±0,25
HGB [g/dl]	16±1,00	14,7±1,90	15,35±0,67	13,32±0,35	12,73±0,32	13,8±0,43	16,5±1,50	14,6±1,5	15,75±0,52	13,38±0,59	12,9±0,35	14,15±0,48
HCT [%]	46,8±3,20	43,5±4,50	44,23±1,56	38,9±0,72	37,52±0,92	40,43±1,74	48,1±4,90	43,55±4,05	46±1,34	39,62±1,61	38,13±0,96	41,4±2,28
MCV [fL]	89±3,4	82,35±5,85	87,3±2,71	89,55±1,85	91,45±1,63	90,03±0,50	88,25±1,55	86,75±285	89±2,69	90,14±1,79	90,65±0,74	90,43±0,13
MCH [pg]	30,45±1,35	27,8±2,70	30,28±1,05	30,68±0,92	31,03±0,37	30,78±0,27	30,35±0,85	29,05±125	30,48±1,18	30,46±0,93	30,68±0,18	31,03±0,67
MCHC [g/dl]	34,2±0,20	33,7±0,90	34,68±0,37	34,22±0,37	33,95±0,53	34,18±0,39	34,35±0,35	33,5±0,30	34,25±0,62	33,76±0,51	33,15±0,79	34,3±0,74
RDW [%]	13,2±0,00	15,5±3,30	13,15±0,23	13,4±0,51	13,47±0,30	13,58±0,77	12,8±0,00	14,1±1,60	12,7±0,26	13,42±0,32	13,18±0,56	12,93±0,61
PLT [x10³/µl]	211±1,00	168±55	215,5±9,61	274±27,23	227,3±37,62	242±26,69	255±26,00	187,5±56,50	206,8±8,58	273,8±31,04	186,8±24,05	232±33,72
LYM [%]	23,65±2,75	28,65±1,85	24,35±5,34	25,42±2,79	25,35±4,29	29±3,44	24,45±5,85	45,7±16,7	25,58±5,50	26,52±3,19	26,85±5,92	28,25±4,45
Neutrophile [%]	62,55±5,05	52,75±4,85	63,85±6,79	63,6±3,33	63,97±4,68	58,98±3,00	61,95±6,55	36,8±13,5	61,9±6,90	61,32±3,93	59,98±6,26	60,2±4,62
Monozyten [%]	8,55±0,25	12,25±0,85	8,65±0,70	7,42±0,65	7,5±0,35	8,25±0,55	8,3±0,60	12,7±1,50	9,125±0,96	8,52±0,51	9,775±1,04	7,73±0,73
Eosinophile [%]	4,35±1,95	5,6±1,90	2,45±1,03	2,8±0,65	2,4±0,73	2,58±0,98	4,1±1,00	4,05±1,55	2,68±0,94	2,84±0,87	2,75±0,83	2,7±0,59
Basophile [%]	0,9±0,10	0,75±0,25	0,68±0,17	0,76±0,18	0,63±0,15	1,2±0,31	1,2±0,30	0,75±0,15	0,73±0,19	0,8±0,14	0,65±0,144	1,13±0,24
Interleukin 1β [pg/ml]	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Interleukin 6 [pg/ml]	3,1±0,30	1,7±0,20	2,68±0,69	3,28±0,49	3,57±0,49	1,87±0,55	3,65±0,95	4,3±0,00	2,88±0,48	5,68±3,12	4,7±1,93	3,53±0,99
CRP [mg/l]	2,2±0,10	<1	2,23±0,69	1,52±0,45	3,74±0,76	1,75±0,17	3,3±0,40	1,3±0,30	1,55±0,42	4,15±3,15	3,167±1,10	1,48±0,21
Cholesterin [mg/dl]	187±40	175,5±8,50	152,8±11,96	193,4±20,56	205,5±18,33	237±37,28	196±38,00	190±3,00	167,5±13,99	208,8±21,20	199,8±26,36	252,8±38,04
HDL [mg/dl]	52,5±5,5	49,5±11,50	46,5±6,02	56,4±3,76	70,67±5,16	77,5±12,63	51,5±3,5	55,5±12,50	51,75±9,00	68±5,92	71,5±7,60	91±15,5
LDL [mg/dl]	127,5±36,5	120,5±1,50	100,3±10,93	127,8±20,22	125,8±17,79	162,8±26,35	133,5±36,50	133,5±19,50	110,3±12,15	137,4±19,49	125,8±22,67	166,3±24,38
LDL/HDL	2,382±0,45	2,581±0,62	2,27±0,36	2,26±0,28	1,79±0,24	2,11±0,14	2,56±0,54	2,62±0,94	2,34±0,50	2,06±0,32	1,773±0,30	1,86±0,16
Triglyceride [mg/dl]	137,5±12,5 0	91±17,00	105,3±14,70	137±25,56	122,5±8,89	93,25±19,19	158,5±3,50	101±8,00	97±18,36	105,2±7,64	105±10,09	108,3±9,30

HbA1c (NGSP) [%]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5,8±0,10	5,9±0,20	6,1±0,36	5,78±0,20	6,1±0,32	5,75±0,16
HbA1c (IFCC) [mmol/mol]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	39,9±1,10	41±2,20	43,18±3,90	39,68±2,21	43,18±3,48	39,35±1,71
mittlerer Blutglucosegehalt [mg/dl]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	120±3,00	122,5±5,50	128,5±10,21	119,2±5,88	128,5±9,10	118,3±4,42
Glucose [mg/dl]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	111,5±4,5	106±12,00	115,5±5,95	101,4±3,28	121,8±10,85	100,3±0,85

Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Tagen ± SEM; BMI Body Mass Index CRP c-reaktives Protein HCT Hämatokrit HDL High density lipoprotein HGB Hämoglobin IFCC Ionenaustausch-HPLC MCH mittleren korpuskulären Hämoglobingehalt MCHC mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration NGSP National Glycohemoglobin Standardization Program LDL low density lipoprotein LYM Lymphozyten RBC Rote Blutzellen PLT Blutplättchen WBC Weiße Blutzellen WHR Waist-Hip Ratio.

Tabelle A2 MIND AD_{mini}-Studie-Mitochondriale Komplexaktivität.

	Kontrolle			Lifestyle			Lifestyle&Food		
Gruppe	<i>Visit 1</i> n=6	<i>Visit 2</i> n=6	<i>p-Wert</i>	<i>Visit 1</i> n=5	<i>Visit 2</i> n=5	<i>p-Wert</i>	<i>Visit 1</i> n=7	<i>Visit 2</i> n=7	<i>p-Wert</i>
O2k-Oxygraph [pmol/(s*IU CS)]									
Endogene Atmung	76,51±4,21	111,5±11,37	0,02*	98,77±12,13	108,0±20,65	0,77	79,60±9,40	95,08±8,02	0,32
KI	129,6±10,87	130,4±9,21	0,95	97,33±20,54	151,8±13,20	0,15	116,7±7,80	127,8±6,27	0,27
OXPHOS	251,6±17,31	467,3±10,63	0,0002***	249,6±24,34	413,2±33,76	0,01*	242,3±26,58	402,9±18,26	0,004**
ETS	464,5±21,33	488,9±21,11	0,44	435,6±48,20	430,9±21,26	0,95	400,3±61,24	428,3±22,81	0,74
KII _{ETS}	279,0±11,89	300,2±19,17	0,32	250,3±40,98	256,1±16,30	0,92	270,0±24,44	250,2±16,85	0,23
KIV	487,1±43,67	244,6±33,04	0,004**	505,2±16,66	224,5±48,95	0,01*	466,8±51,63	240,0±55,34	0,04*

Dargestellt sind Mittelwerte±SEM, ungepaarter t-test, signifikante Unterschiede sind durch ein * markiert; (*p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001). CS Citratsynthase K Komplex ETS Elektronentransportsystem OXPHOS Oxidative Phosphorylierung.

Danksagung

Während der Zeit meiner Promotion haben mich viele Menschen begleitet, beraten, motiviert und unterstützt. Ohne diese vielen lieben Begleiter wäre meine Promotion nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich dafür von Herzen bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gunter Eckert für den stets unkomplizierten und hilfsbereiten Umgang, das viele Vertrauen in meine Arbeit und meine Ideen, seine Unterstützung in allen Belangen und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und die erlebnisreichen gemeinsamen Aktivitäten.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Michael Martin für die Unterstützung und die stets angenehme und unkomplizierte Zweitbetreuung meiner Arbeit bedanken.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe vom Institut für Ernährung in Prävention und Therapie. Danke Petze und Dani, dass ihr uns nach unserem Umzug mit offenen Armen empfangen habt und für die viele Unterstützung bei allen administrativen Belangen. Vielen Dank an alle Eckis für die schöne gemeinsame und sektreiche Zeit sowie die Teilnahme an meinen zahlreichen Forschungsprojekten.

Bei dem ehemaligen Team aus Frankfurt, Heike Asseburg, Stephanie Hagl, Maximilian Pohland, Rekha Grewal und Martina Heinrich möchte ich mich für die tolle Anfangszeit und die vielen schönen Momente während der Zeit im Labor und auch noch danach bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Achim Schmidtke und Herrn Prof. Jochen Klein, die mir nach dem Umzug nach Gießen weiterhin die Räumlichkeiten und Geräte für die Durchführung der Studien in Frankfurt zur Verfügung gestellt haben. Ein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmazie, die bei der Durchführung ihrer Versuche stets Rücksicht auf meinen Studienplan genommen haben und mir in der ein oder anderen schwierigen Situation ausgeholfen haben. Vielen Dank auch für die vielen guten Gespräche in der Küche und die unvergesslichen, gemeinsamen Abende. Ich bin immer wieder sehr gerne zu euch zurückgekehrt.

Ich danke auch meinen Kooperationspartnern von der Uniklinik Frankfurt, Herrn Prof. Pantel, Frau Prof. Hattingen, Herr Dr. Pilatus, Frau Dr. Silke Matura, Nasir Ludin, Bianca Lienerth, Nadine Brüche und dem MIND AD_{mini}-Team für die tolle und produktive Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Für die Unterstützung im Labor möchte ich mich weiterhin bei Carolin Muley, Jendrik Grube, Lea Blum und Lena Wachter bedanken, die im Rahmen ihrer Bachelor- und Masterarbeiten bei der Generierung von Daten für meine vorliegende Arbeit mitgewirkt haben.

Ich möchte allen Studienteilnehmern danken, die keine Kosten und vor allem Mühen gescheut haben, um meine Kollegen und mich mit ihrer Teilnahme bei unseren Forschungsvorhaben zu unterstützen. Ohne die vielen freiwilligen, motivierten Probanden, hätten die Studien nicht durchgeführt werden können.

Den fleißigen und motivierten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Blutspendedienst Gießen möchte ich ganz herzlich für die Durchführung unzähliger Blutabnahmen danken.

Außerdem möchte ich Dr. Nelli Baal für die Vermessung der Proben mittels FACS-Analyse danken.

Für die Mühe, diese Arbeit hinsichtlich Rechtschreibung und Grammatik zu überprüfen, bedanke ich mich bei Johanna Müdicken und Maximilian Klöckner.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde, die mich immer motiviert und unterstützt haben. Gerade in den stressigen Studien- und Schreibphasen habt ihr an mich geglaubt, wart sehr verständnisvoll und habt mich mit kleinen Leckereien und lieben Worten motiviert. Vielen Dank auch für die rege Teilnahme an meinen Studien.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht und mich stets bei meinem Promotionsvorhaben unterstützt haben. Vielen Dank für die vielen beratenden, motivierenden Gespräche und auch hier für die Teilnahme an meinen Studien. Auch meinen Schwiegereltern möchte ich für ihre Unterstützung und das große Verständnis danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Schwester Ricarda für die Unterstützung während der Promotion, beim Bewerbungsprozess und bei der Fertigstellung der Arbeit. Rici, du warst mir immer ein Vorbild und ich konnte viel von deiner Erfahrung profitieren.

Der größte Dank gilt meinem Ehemann Kosta für seine Liebe, sein Vertrauen, seine Unterstützung und sein Verständnis während meines gesamten Bildungsweges. Bei unserem Kennenlernen habe ich noch von einer Ausbildung gesprochen und am Ende hat er mich während meiner gesamten akademischen Laufbahn immer wieder motiviert, getröstet, meine Launen ertragen, stets an mich geglaubt und sich selbst häufig hinter meiner Arbeit zurückgestellt. Außerdem war er sich nie zu schade, sich handwerklich oder als Proband an meinen Projekten zu beteiligen.

Veröffentlichte Original- und Übersichtsarbeiten

Silaidos, C.; Grube, J.; Muley, C.; Eckert, G. P. (2020): Time-dependent melatonin secretion is associated with mitochondrial function in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of male volunteers. In: *Mitochondrion* 53, S. 21–29. DOI: 10.1016/j.mito.2020.04.006.

Reutzel, Martina; Grewal, Rekha; Dilberger, Benjamin; Silaidos, Carmina; Joppe, Aljoscha; Eckert, Gunter P.; Jadeja, Ravirajsinh (2020): Cerebral Mitochondrial Function and Cognitive Performance during Aging: A Longitudinal Study in NMRI Mice. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2020, S. 4060769. DOI: 10.1155/2020/4060769.

Dilberger, Benjamin; Passon, Maike; Asseburg, Heike; Silaidos, Carmina V.; Schmitt, Fabian; Schmiedl, Tommy et al. (2019): Polyphenols and Metabolites Enhance Survival in Rodents and Nematodes-Impact of Mitochondria. In: *Nutrients* 11 (8). DOI: 10.3390/nu11081886.

Reutzel, Martina; Grewal, Rekha; Silaidos, Carmina; Zotzel, Jens; Marx, Stefan; Tretzel, Joachim; Eckert, Gunter P. (2018): Effects of Long-Term Treatment with a Blend of Highly Purified Olive Secoiridoids on Cognition and Brain ATP Levels in Aged NMRI Mice. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018, S. 4070935. DOI: 10.1155/2018/4070935.

Silaidos, C.; Pilatus, U.; Grewal, R.; Matura, S.; Lienerth, B.; Pantel, J.; Eckert, G. P. (2018): Sex-associated differences in mitochondrial function in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and brain. In: *Biology of sex differences* 9 (1), S. 34. DOI: 10.1186/s13293-018-0193-7.

Asseburg, Heike; Schäfer, Carmina; Müller, Madeleine; Hagl, Stephanie; Pohland, Maximilian; Berressem, Dirk et al. (2016): Effects of Grape Skin Extract on Age-Related Mitochondrial Dysfunction, Memory and Life Span in C57BL/6J Mice. In: *Neuromolecular medicine* 18 (3), S. 378–395. DOI: 10.1007/s12017-016-8428-4.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift