

Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. Hans- Jürgen Kaatsch  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian –Albrechts-Universität zu Kiel

DAS AUFTRETEN DER 4977 BP DELETION DER  
MITOCHONDRIALEN DNA IN BLUT, MILZ, KNOCHENMARK UND  
SKELETTMUSKEL IN BEZUG AUF DAS LEBENSALTER

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**ANNIKA MAREIKE ERTTMANN**

aus KIEL

Kiel 2010

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Nicole von Wurmb-Schwark,  
Institut für Rechtsmedizin

2.Berichterstatter: PD Dr. W. Klapper,  
Institut für Pathologie

Tag der mündlichen  
Prüfung: 01.09.2010

Zum Druck genehmigt,  
Kiel, den 08.07.2010

gez. Annika Mareike Erttmann

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1-9</b>
1.1	Das Mitochondrium	1
1.2	Die mitochondriale DNA	2
1.2.1	Aufbau der mitochondrialen DNA	2
1.2.2	DNA –Schädigungen	4
1.3	Deletion der mitochondrialen DNA	5
1.3.1	Die 4977 bp „common deletion“	5
1.3.2	Die 4977 bp Deletion und Lebensalter	7
1.3.3	Die 4977 bp Deletion und externe Einflüsse	7
1.4	Blut und blutbildende Gewebe	8
1.4.1	Knochenmark	8
1.4.2	Milz	9
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>10-11</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>12-21</b>
3.1	Proben	12
3.2	DNA –Extraktion	12
3.2.1	Super Quick Gene Kit von Immucor zur DNA Gewinnung aus Gewebe	12
3.2.2	Genomic DNA Purification Kit von Puregene®	14
3.2.3	Super Quick Gene Kit von Immucor zur DNA Gewinnung aus Blut	14
3.2.4	Aus Blut mittels Aussalzmethode nach Wash et al.	15
3.2.5	Nucleo Spin Blood Quick Pure (Machery – Nagel)	16
3.3	Überprüfung der DNA –Qualität und Quantität	17
3.3.1	Photometrische Messung	17
3.3.2	Gelelektrophorese	17
3.4	PCR –Polymerase Chain Reaktion	18
3.5	Amplifikation von mtDNA in einer Duplex-PCR	18
3.6	Analyse der PCR –Produkte	20
3.7	Kapillarelektrophorese	20

---

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22-39</b>
4.1	DNA-Extraktion aus verschiedenen Geweben	22
4.1.1	DNA –Extraktion aus Blut	22
4.1.2	DNA –Extraktion aus Milz, Knochenmark und Skelettmuskel	23
4.2	Amplifikation von nukleärer und mitochondrialer DNA	24
4.2.1	Amplifikation von nukleärer und mitochondrialer DNA nach verschiedenen Extraktionsverfahren	25
4.2.1.1	Im Blut	26
4.2.1.2	Im Milzgewebe	27
4.2.1.3	Im Knochenmark	28
4.2.1.4	Im Skelettmuskelgewebe	28
4.3	Amplifizierbarkeit von mitochondrialer und nukleärer DNA in verschiedenen Geweben	29
4.4	Amplifikation von spezifisch 4977 bp deletierter mtDNA	30
4.4.1	Altersabhängigkeit der 4977bp Deletion	31
4.5	Geschlechtsabhängigkeit der 4977 bp Deletion	35
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40-59</b>
5.1	Auswahl des Probenmaterials	40
5.2	Auswahl der verschiedenen Gewebe	41
5.3	Auswahl der DNA Extraktions-Methode	42
5.3.1	Qualität und Quantität	42
5.3.2	Einfluss auf die Untersuchungsmethode	43
5.4	Relative Quantifizierung von PCR Produkten mittels Duplex-PCR und automatischer Fragmentanalyse	44
5.5	Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion	46
5.5.1	Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion im differenzierten Gewebe	47
5.5.1.1	Skelettmuskel	47
5.5.1.2	Blut	49
5.5.2	Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion im hämatopoetischen Gewebe	52
5.5.2.1	Knochenmark	53
5.5.2.2	Milz	54
5.6	Weitere mögliche Einflüsse auf die mitochondriale DNA (Lifestyle)	55
5.6.1	Schäden durch exogene Faktoren	56
5.6.2	Schäden durch endogene Faktoren	58

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>60-61</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>62-72</b>
7.1	Geräte	62
7.2	Verbrauchsmaterialien	62
7.3	Chemikalien	63
7.4	Ansatz und Vorbereitung der Lösungen und Reagenzien	64
7.5	Abkürzungen	65
7.6	Tabellen	66
7.7	Statistik	73
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>74-83</b>
	Erklärung	84
	Danksagung	85
	Lebenslauf	86

## **1 Einleitung**

### **1.1 Das Mitochondrium**

Mitochondrien sind circa 5  $\mu\text{m}$  lang und haben einen Durchmesser von 0,5-1  $\mu\text{m}$ . Sie sind vielgestaltig, doch meist länglich ellipsoid (Alberts et al., 1990). Die Anzahl an Mitochondrien variiert zelltypabhängig (Leber > Hirn) (Bogenhagen & Clayton, 1974; Wallace, 1986; Kiechle et al., 1996). Das Mitochondrium ist insbesondere für die Zellatmung (Citratzyklus, Elektronentransportkette und oxidative Phosphorylierung) verantwortlich. Mit Hilfe von Sauerstoff wird an den mitochondrialen Doppelmembranen ATP (Adenosintriphosphat) hergestellt. ATP ist der wichtigste Energielieferant bei nicht Photosynthese-betreibenden Zellen. Die meisten intrazellulären Stoffwechselforgänge sind direkt oder indirekt ATP-abhängig. Eine weitere wichtige Aufgabe des Mitochondriums ist die Calcium-Ionenspeicherung.

Die Endosymbiontenhypothese postuliert, dass die Mitochondrien als Bakterien in andere Einzeller eingewandert sind. So erst konnte sich die Entwicklung von den anaeroben zu den aeroben Einzellern und so zu komplexen Lebewesen vollführen. Dieser Hypothese liegen zum einen der Aufbau der Mitochondrien mit ihrer Doppelmembran zu Grunde, zum anderen besitzen die Mitochondrien eine eigene DNA. Sie werden wie Plasmide als semiautonome Organellen bezeichnet. Sie sind zur Autoreduktion fähig. Innerhalb eines Zellzykluses wird die Anzahl an Mitochondrien verdoppelt (Robin & Wong, 1988). Die Teilung erfolgt wie bei Bakterien durch Septenbildung in Längsrichtung.

Autonom allerdings wäre das Mitochondrium weder zur Duplikation mitochondrialer DNA (= mtDNA) noch zur Proteinbiosynthese fähig (King et Attaradi, 1989; Schwarz et Neupert, 1994; Fetton, 1995; Kadenbach 1990). Hierzu benötigt es extramitochondriale, also zellkernkodierte Proteine, die über Transportproteine nach intramitochondrial gelangen.

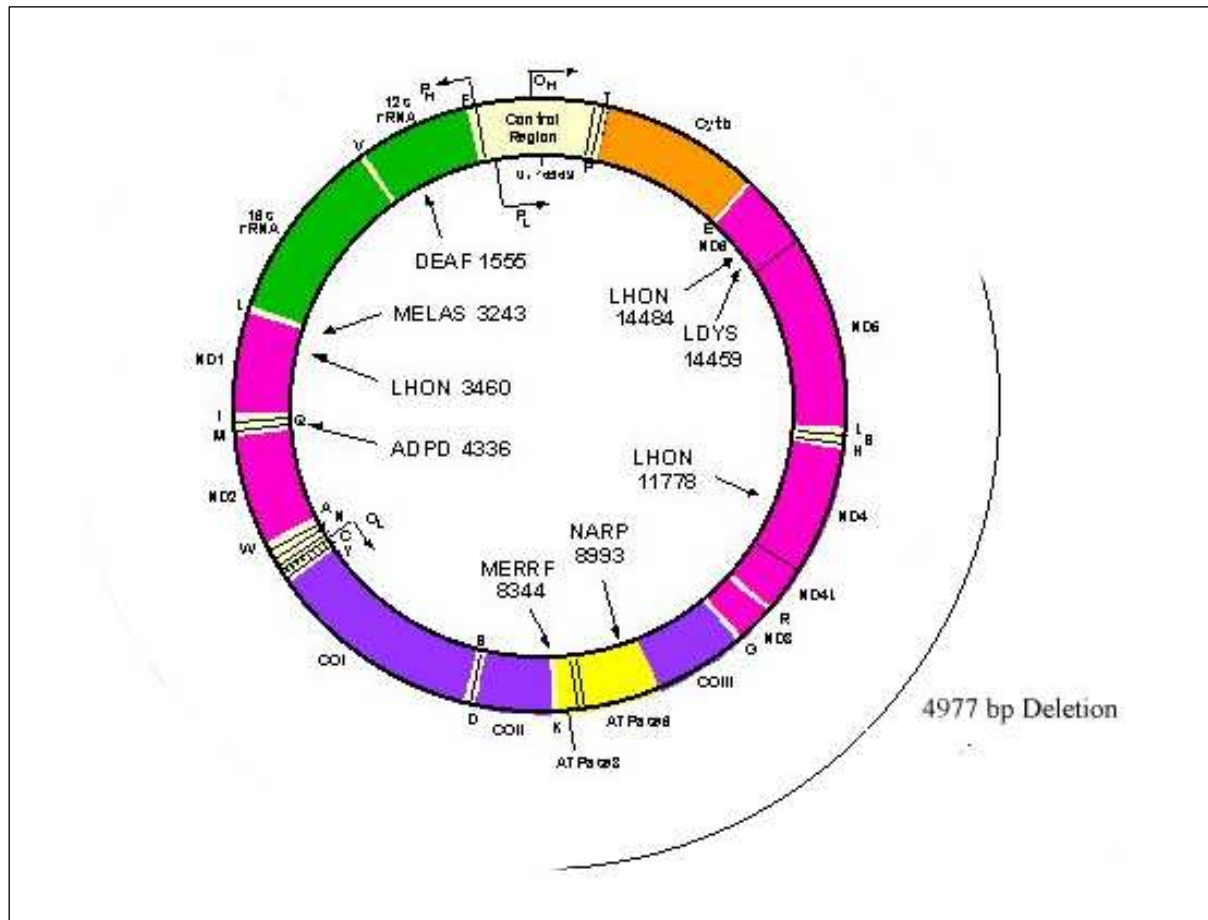
## **1.2 Die mitochondriale DNA (=mtDNA)**

### **1.2.1 Aufbau mitochondrialer DNA**

Das humane mitochondriale Genom ist zirkulär aufgebaut und an die innere Membran gebunden. Etwa 0,5 % der gesamten Zell-DNA in Mammalia entfällt auf die mtDNA. Die mtDNA wird fast nur maternal vererbt, das Spermium selbst steuert nur die nukleäre DNA (nDNA) bei. MtDNA ist somit nicht rekombinant (Giles et al., 1980). Das humane mtDNA Genom umfasst 16.569 bp (Anderson et al., 1981) und liegt meist in 5-10 identischen Kopien pro Mitochondrium vor (Kaldenbach, 1990).

Die mtDNA ist bis auf kurze Abschnitte, die D-Schleifen (drei Stränge), doppelsträngig aufgebaut (Abb.1). Die D-Loop-Sequenz (D=displacement) markiert die Startregion der H-Strang-Replikation. Sie umfasst 1.123 bp und ist hoch-polymorph (Stoneking et al, 1991; Horai & Hayasaka, 1990). Er dient der zellulären und genomischen Interaktion zwischen kernkodierten Proteinen, RNAs und der mtDNA und regelt so die Transkription und Replikation.

Die Translation mitochondrialer DNA erfolgt mit Hilfe einer nukleärcodierten mitochondrialen RNA-Polymerase. Im Gegensatz zur nDNA ist die mtDNA nicht methyliert, nicht mit Histonen komplettiert und damit auch nicht in Nukleosomen organisiert (Kaldenbach, 1990). Auf Grund ihrer Dichte nach Denaturierung unterscheidet man einen H-Strang (heavy) und einen leichten L-Strang (light). Der Replikationsstartpunkt wird als Ori-L bzw. Ori-H bezeichnet. Der H-Strang enthält die meisten Gene, die ohne Introns dicht gepackt sind und für 13 Proteine, 2 RNAs und 22 tRNAs codieren. Der L-Strang kodiert nur für ein Protein und für 14 tRNAs (Stryer, 1991). Alle mtDNA-codierten Proteine dienen der Atmungskette. Bei der Expression helfen eigene Ribosomen, eigene tRNA und Enzyme.



**Abbildung 1: Ringstruktur des humanen mitochondrialen Genoms. Schematische Darstellung.** Die Abbildung zeigt die von Anderson et al. (1981) entschlüsselte Karte der mtDNA mit den Ansatzstellen ( $O_H$  und  $O_L$ ) für den H- und den L-Strang. Der umgebende Viertelkreis beschreibt den Bereich, der von der 4977 bp („common“) Deletion betroffen ist (Emery University Atlanta GA 30 322).

Die gesteigerte Produktion von Sauerstoff-Radikalen in der Atmungskette bedingt eine im Vergleich zur nukleären DNA bis zu zehnfach erhöhte Mutationsfähigkeit der mtDNA (Brown et al., 1979; Vawter et Brown, 1986; Grivell, 1989). Ein weiterer Faktor hierbei ist die verminderte Genauigkeit bei der DNA-Reduplikation und die geringere Anzahl an Reparaturmechanismen der mtDNA (Clayton et al., 1974; Ames, 1989). Daher weist die mtDNA viele Sequenzpolymorphismen auf. Die humane mtDNA ist sehr kompakt, zum Teil überschneiden sich Gene (ATPase-Untereinheiten 6 und 8) (Nardelli et al., 1994).



Der universelle genetische Code gilt auch hier bis auf 4 von 64 Codons. Leichte Varianten des genetischen Codes gibt es weiterhin in den Mitochondrien unterschiedlicher Organismen (Singer et Berg, 1992).

### **1.2.2 DNA-Schädigungen**

Die DNA unterliegt ständig endogen und exogen bedingten Veränderungen. Diesen DNA-Schäden unterschiedlichster Ursachen steht ein ganzes Arsenal von Reparaturmechanismen gegenüber. Aber nicht alle im Cytosol vorhandenen Mechanismen sind auch in den Mitochondrien vorhanden. Die mitochondriale DNA-Polymerase  $\gamma$  hat eine besonders hohe Fehlerquote bei der Replikation. Weiterhin ist die Replikationsrate der mtDNA wegen ihrer kurzen Halbwertszeit und der Unabhängigkeit vom Zellzyklus besonders hoch.

Exogen schädigend sind unter anderem UVA- bis UVC-Strahlen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlen, Nikotin-, Alkoholabusus und Viren.

Der zu Grunde liegende schädigende Mechanismus ist die Entstehung freier Radikale. Sie entstehen aber auch im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung als Nebenprodukt in Form von Superoxidradikalen oder Hydroxylradikalen.

Freie Radikale sind Moleküle mit einem unpaaren Elektron. Dadurch sind sie in der Lage, anderen Molekülen Elektronen abziehen. Die so entstandenen Reaktionsprodukte sind selbst hoch reaktiv. Von ihnen geht die schädigende Wirkung auf Proteine, Lipide und DNA aus. Die Auswirkung des geschädigten Moleküls ist nicht zuletzt abhängig von der Funktion und Lebensdauer (Proteine < DNA). Die mtDNA ist dabei insbesondere gefährdet, da sie nicht durch Histone komplettiert wird.

Mutationen, die den proteincodierenden Bereich eines Gens betreffen, können zum Aminosäureaustausch, der Verschiebung des Leserahmens und einem meist verkürzten Protein oder bei Translokation zu einem neu gebildeten Fusionsprotein führen. Da die mtDNA nur aus Introns besteht,

---

führt eine Mutation praktisch immer zu einer Veränderung der Genprodukte.

Dabei unterscheidet man verschiedene Genmutationen:

- Punktmutationen – Austausch einer Base gegen eine andere
- Blockmutation – Austausch mehrerer Basen  
(Transition – Austausch von Purinbasen,  
Transversion – Austausch von Pyrimidinbasen )
- Deletion – Verlust von Basen
- Insertion – Einfügen von Basen

### **1.3 Deletionen der mitochondrialen DNA**

Unter Deletion versteht man den Verlust eines interstitiellen Chromosomenstücks oder eines DNA-Abschnitts infolge einer Mutation. Mittlerweile wurden circa 100 verschiedene mtDNA-Deletionen gefunden. Sie sind Ursache vieler verschiedener Krankheiten. Vermutet wird, dass die deletierten DNA-Fragmente durch die mitochondriale Membran hindurch ins Zytoplasma gelangen und hier in die nukleäre DNA eingebaut werden können

Der genaue Entstehungsmechanismus von Deletionen ist nicht geklärt. Sicher scheint nur, dass sie häufig Wiederholungssequenzen (direct repeats) flankiert sind, die offenbar besonders anfällig für Angriffe freier Radikale sind (Tanaka-Yamamoto et al., 1989; Hou et Wei, 1996). Diese direct repeats haben eine Länge von 5-13 bp und sind deletionspezifisch.

#### **1.3.1 Die 4977 bp „common deletion“**

Die verbreiteteste Deletion ist die 4977 bp Deletion; in 80-90 % flankiert von 13 bp umfassenden direct repeats. Diese sind wahrscheinlich die Angriffspunkte („hotspot“) für die Entstehung dieser Deletion (Schon et al., 1989; Shenkar et al., 1996). Die 4977 bp Deletion liegt zwischen der Position 8470-8482 und 13447-13459 des humanen mitochondrialen Genoms.

Auch nukleäre Mutationen sind als Ursache für die Entstehung der 4977 Deletion denkbar, da alle Proteine, die für die Replikation der mtDNA nötig sind vom Kern kodiert werden. Hierfür spricht, dass Deletionen der mtDNA nicht nur spontan oder maternal auftreten, sondern auch autosomal dominante Erbgänge vorkommen (Zeviani et al., 1992 a, b; Yuzaki et al., 1989; Servidei et al., 1991). Im Mitochondrium selbst führen Deletionen zu Störungen der Proteinbiosynthese (Mita et al., 1989; Moraes et al., 1991 a, 1992 a; Shoubridge et al., 1990; Nakase et al., 1990; Ballinger et al., 1992). Man geht davon aus, dass Deletionen, unabhängig von ihrer Lokalisation, immer mit Störungen der Translation einhergehen, da die mitochondriale Transkription polycystrisch erfolgt und immer auch t-RNA verloren geht. Diese Störungen können dann Bereiche außerhalb der Deletion betreffen, wie es bei der common-Deletion der Fall ist (CoxII, ND 1) (Mita et al., 1985).

Die kürzere Replikationszeit auf Grund des kleineren Genoms wird für die Akkumulation deletierter mtDNA (= dmtDNA) verantwortlich gemacht. Es ist dabei nicht völlig klar, ob deletierte mtDNA neben intakter mtDNA (=wtmtDNA) im selben oder in verschiedenen Mitochondrien existieren und ob verschiedene Deletionen in ein und derselben Zelle oder gar Mitochondrium vorkommen.

Das Auftreten der 4977 bp Deletion wurde ferner bei einer Reihe mitochondrialer Erkrankungen gehäuft beobachtet, zunächst bei mitochondrialen Myopathien, z.B. Kearns-Sayre Syndrom (Zeviani et al., 1988; Pouton et al., 1995), CPEO (chronic progressiv external ophthalmoloia) (Nauman et al., 1995; Bohlega et al.,1996) LHON (Leber´s hereditary optic neuropathy) (Riordan-Eva et al., 1995), MERFF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers (Shih et al., 1991), und das Pearson-Knochenmark-Pankreas-Syndrom (Röting et al., 1991). Dabei besteht keine eindeutige Korrelation zwischen der Menge an deletierter mtDNA und dem Schweregrad des chronischen Krankheitsbildes, dem Sitz oder dem Ausmaß des biochemischen Defektes in der Atmungskette

(Moraes et al, 1989; Shanke et al, 1990; Nakase et al, 1990; Gerbitz et al, 1990).

### **1.3.2 Die 4977 bp Deletion und Lebensaltern**

Die 4977 bp Deletion wurde zuerst bei Personen > 20 Jahre in Biopsie- (Simonetti et al., 1992) und Autopsiematerial (Münscher et al., 1993; Baumer et al., 1994) nachgewiesen.

In weiteren Studien wurde eine Abhängigkeit zwischen dem Auftreten dieser Deletion und dem Lebensalter entdeckt (Corral-Debrinski et al., 1992; Larsson et al., 1991, Meissner et al., 1997 u. 1999; Soong et al., 1992). Dies scheint allerdings nur für gut differenzierte Gewebe mit einer niedrigen Mitoserate und hohem Energiebedarf wie Gehirn und Skelettmuskulatur zu gelten (Meissner et al., 1997). In diesen Geweben finden sich altersabhängig Akkumulationen der 4977 bp Deletion, die einen hohen Korrelationskoeffizienten wie Skelettmuskulaturgewebe erreichen können (Wurm et al., 2002).

Auch in Gewebe mit hohem Turnover wie Haut oder Blut (v. Wurmb et al., 1998) wurde die 4977 bp Deletion gefunden, hier jedoch ohne offensichtliche Korrelation zum Alter.

### **1.3.3 Die 4977 bp Deletion und externe Einflüsse**

Andere Studien z.B. an Lebergewebe führten zu kontroversen Ergebnissen bezüglich einer Alterskorrelation (Lee et al., 1994; Yen et al., 1991 u. 1994). Größeren Einfluss haben hier vermutlich externe Faktoren wie Alkohol- (Cahill et al., 1997), Nikotin- und Medikamentenabusus. Insbesondere der hohe Zell-turnover z.B. im Blut und in der Haut begünstigt hier das Auftreten der 4977 bp Deletion, da zum einen die dmtDNA schneller als wtDNA repliziert wird und zum anderen weniger Zeit für Reparaturmechanismen zur Verfügung steht als bei Zellen mit einem niedrigeren turnover (Nishioka et al., 2004).

## 1.4 Blut und blutbildende Gewebe

Die postnatale Blutbildung findet beim Gesunden im Knochenmark und in den lymphatischen Organen statt (Tab. 1). Die Erythropoese, die Granulopoese (neutrophil, eosinophil und basophil), die Megakaryozytopoese und zum kleinen Teil auch die Lymphopoese sind im Knochenmark lokalisiert, der überwiegende Teil der Lymphopoese erfolgt in den lymphatischen Organen (Milz, Thymus und Leber) (Benninghoff Anatomie, 1994). In dieser Arbeit wird die mitochondriale Mutagenese in Blut und blutbildenden Organen untersucht.

**Tab1: Stadien der Erythro- und Granulopoese** (Benninghoff Anatomie, 1994).

Erythropoese	Granulopoese	Thrombozytopoese	Lymphopoese
Makroblast	Myeloblast		Lymphoblast
Erythroblast	Promyelozyt	Megakaryoblast	
Retikulozyt	Myelozyt	Megakaryozyt	
Erythrozyt	Granulozyt	Thrombozyt	Lymphozyt

### 1.4.1 Knochenmark

Das Knochenmark umfasst die Markhöhle und die Spongiosahöhlen. Man unterscheidet drei Arten:

- Rotes Knochenmark
- Gelbes Knochenmark
- Gelatinöses Knochenmark

In dieser Arbeit wird nur das für die Hämatopoese wichtige rote Knochenmark betrachtet. Es findet sich bei Kleinkindern in allen Knochen, bei Erwachsenen nur noch in den platten Knochen (Schädel, Sternum, Darmbeinschaukel) oder in den spongiösen Anteilen der Röhrenknochen sowie Wirbeln und Rippen. Die Markhöhlen sind mit Endothel ausgekleidet, von dem aus sich retikuläres Bindegewebe aufspannt, in dessen Maschen sich kleine Arteriolen und die Zellen der Blutbildung befinden. Diese Arteriolen werden von den Aa. Nutritiae gespeist und münden letztendlich

in die venösen Sinusoide. Sinusoide besitzen gefensterte Basalmembranen durch die die Blutzellen praktisch ungehindert passieren können (Benninghoff Anatomie, 1994).

#### **1.4.2 Milz (Splen)**

Das Grundgerüst der Milz besteht aus retikulären Fasern und Retikulumzellen, weshalb die Milz zu den lymphoreticulären Organen zählt. In der Milz grenzt man folgende Kompartimente voneinander ab: Weiße Pulpa, Marginalzone und rote Pulpa. Die Aufgaben der Milz sind zum einen die Filterfunktion, zum anderen die Immunfunktion. Auf die menschliche Milz entfällt circa 3-5 % der Gesamtdurchblutung bei einem Ganzkörpergewichtsanteil von nur 0,3 %. Die rote Pulpa ist für die Reifung der Reticulozyten wichtig. Chromatinreste werden bei der Passage durch die Poren „aus-gemolken“. Bei fehlender Funktion treten im peripheren Blut vermehrt Erythrozyten mit sogenannten „Holly-jolly-Körperchen“ auf. Die menschliche Milz spielt keine Rolle bei der Speicherung von Erythrozyten, da eine Volumenveränderung durch Muskelkontraktionen hier nicht möglich ist und somit auch keine plötzliche Freisetzung von Erythrozyten. Sie enthält jedoch etwa 30 % aller Blutplättchen, die durch z.B. Adrenalin schnell mobilisiert werden können. Die Immunfunktion der Milz ist vergleichbar mit der anderer aliphatischer Organe. Es gibt Areale, die für die Antigenaufnahme besonders geeignet sind, wie die Marginalzone mit vielen Makrophagen und einem langsamen Blutfluss, so dass eine Interaktion zwischen Makrophagen und T- und B-Lymphozyten hier möglich ist. In den Sekundärfollikeln findet die Lymphozytenproduktion statt. Plasmazellen entstehen bevorzugt in der roten Pulpa (Frick, Leonardt, Stark, 1992).

## 2 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der 4977 bp Deletion der humanen mitochondrialen DNA. Es soll eine relative Quantifizierung dieser Deletion in verschiedenen Blut-assoziierten Geweben erfolgen. Hierzu werden Proben aus Milz, Knochenmark, Skelettmuskel und Blut herangezogen. In vorangegangenen Arbeiten ließ sich die 4977 bp Deletion sporadisch schon in diesen Geweben nachweisen. Bisher fehlen jedoch noch systematische Untersuchungen.

In dieser Arbeit soll unter anderem nach dem Ort der Entstehung der 4799 bp Deletion gesucht werden. Findet sich die Deletion bereits vermehrt im Knochenmark, wenn man sie häufig im Blut findet, so könnte dies ein indirekter Hinweis auf das Vorkommen der 4977 bp Deletion schon in Vorläufer- oder Stammzellen sein. Außerdem wird nach einer Korrelation zum Auftreten der Deletion im Skelettmuskel und somit einem Gewebe mit niedrigem Zellturnover gesucht. Ein hohes Vorkommen hier im Vergleich zu dem im Blut könnte bedeuten, dass Zellen in denen die 4799 bp Deletion vorliegt, häufiger apoptotisch werden. Ein niedrigeres Vorkommen dagegen wies darauf hin, dass deletierte mtDNA gegenüber der nicht deletierten mtDNA einen Vorteil bezüglich der Mitose hat, möglicherweise auf Grund des kleineren Genoms.

Es existieren also verschiedene Möglichkeiten der Entstehung der 4977 bp Deletion im Blut: Primär im Knochenmark, sekundär im Blut oder tertiär durch postmortale Artefakte.

Des Weiteren soll die Frage bezüglich der Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion in diesen Geweben beantwortet werden. Hierzu wurden Proben von Personen verschiedener Altersklassen (4- 91 Jahre) und Geschlecht analysiert.

Es ergeben sich folgende Fragen:

Besteht eine altersabhängige Korrelation der Deletion in Blut, Milz, Knochenmark und Skelettmuskel oder ist das Auftreten der 4977 bp-Deletion eher vom biologischen Alter bzw. externen und internen Mediatoren abhängig?

Ist die 4977 bp Deletion primär schon in den hämatologischen Stamm- und Vorläuferzellen vorhanden oder entsteht sie sekundär in der Blutbahn oder eventuell auch als postmortaler Artefakt?

Ist die 4977 bp Deletion- Häufigkeit individuumspezifisch oder gewebe- und umsatzabhängig? Ergibt sich eine Differenz im Vergleich der relativen Häufigkeiten der 4977 bp Deletion in Blut und blutbildenden Organen mit der in Skelettmuskulatur?

Gibt es einen Unterschied bezüglich der Ergiebigkeit oder des Mutationsnachweises der DNA bei verschiedenen Extraktionsverfahren? (=Technische Verfahren als mögliche Fehlerquelle?)



### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Proben**

Im Jahr 2003 wurden von insgesamt 57 ausgesuchten Obduktionsfällen jeweils Proben von Blut (1-2 ml), Skelettmuskel (M. quadriceps femoris, ~1 g), Milz (~1 g) und Knochenmark (Sternum, ~1-2 ml) zusammengetragen. Entnommen worden sind sie in den rechtsmedizinischen Instituten Kiel und Lübeck. Die Proben sind nach Entnahme entweder bei -20 °C tiefgefroren oder direkt verarbeitet worden. Ausgewählt wurden solche Fälle, bei denen keine infektiösen, karzinogenen oder mitochondrialen Erkrankungen bekannt waren. Ein weiteres Ausschlusskriterium war postmortale Fäulnis. Das postmortale Intervall betrug weniger als 48 h.

Das Blut wurde aus der Vena femoralis entnommen, da Herzblut nicht zuletzt durch die anatomische Nähe zum Magen starken enzymatischen Veränderungen ausgesetzt ist.

In allen Fällen wurden lediglich Alter, Geschlecht und Sektionort (Kiel/Lübeck) dokumentiert. Die Anonymität wurde somit gewahrt. Ein Rückschluss auf die Personen ist nicht möglich. Sämtliche entnommenen Proben wurden zu Routinezwecken entnommen.

#### **3.2 DNA-Extraktion**

Insgesamt sind drei verschiedene Extraktionsverfahren zur Anwendung gekommen, die je nach Art der Probe leicht modifiziert, in Bezug auf Ergiebigkeit und experimentellen Aufwand miteinander verglichen wurden. Mit diesen Kits wird die gesamte Zell-DNA gewonnen. Eine spezielle Isolierung der mtDNA wurde in keinem Fall durchgeführt.

##### **3.2.1 Super Quick Gene Kit von Immucor zur DNA-Gewinnung aus Gewebe**

Der Immucor-Kit wird für die DNA-Gewinnung aus Skelettmuskel-, Milz- und Knochenmarkproben eingesetzt. Es werden jeweils ca. 200 mg Gewebe eingesetzt. Da die DNA-Ausbeute aus Muskelgewebe gering ist,

wird hier etwas mehr Gewebe benötigt, um annähernd die gleiche Ausbeute zu erhalten.

Die Proben werden mit einem Skalpell zerkleinert, in ein 50 ml Röhrchen (Saarstedt) gegeben. Diese werden mit 1,5 ml WBC (White blood cell buffer) und 20 µl DTT (Dithiothreitol) beschickt und ca. 30 sec gevortext. Zur Zellyse werden die Proben für mindesten 1 h in einem Wasserbad bei 56 °C inkubiert. Anschließend werden sie für 30 sec gevortext. Die Proben werden mit 500 µl Protein precipitating reagent (PPR) und 200 µl SDS (Sodiumdodecylsulfat) versetzt, um sie dann für mindestens weitere 15 min bei 56 °C zu inkubieren. Nun werden die Proben für 20 min bei 5.000 upm zentrifugiert. Wenn der Überstand weitgehend klar ist, wird er in ein neues Röhrchen (50 ml) überführt. Bei trübem Überstand muss erneut zentrifugiert werden. Das DNA-Gemisch wird mit eiskaltem Ethanol absolut auf 7 ml aufgefüllt, leicht geschüttelt und über Nacht zum Ausfällen im Eisfach inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgt eine fraktionierte Zentrifugation. Jeweils 1,5 ml des DNA-Ethanolgemischs werden in Reaktionsgefäße überführt und mindestens 5 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Nun wird wieder mit 1,5 ml der gleichen Probe aufgefüllt und erneut zentrifugiert bis das gesamte DNA-Ethanolgemisch aufgebraucht ist. Zum Waschen der pelletierten DNA werden 500 µl 70% -iger Ethanol aufpipetiert.

Das Reaktionsgefäß wird leicht geschwenkt und 5 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Dann wird der Alkohol dekantiert. Das so erhaltene Pellet kann entweder 1 h bei Raumtemperatur oder 5 bis 10 min im Brutschrank (60 °C) getrocknet werden. Das Pellet wird nun in 500 µl sterilem Bidest unter Vortexen und Ansnipsen mit dem Finger vollständig gelöst. In hartnäckigen Fällen kann eine Inkubierung im Thermoschüttler bei 37 °C angeschlossen werden.

### **3.2.2 Genomic DNA Purification Kit von PUREGENE®**

Der Gentra-Kit wird für die Skelettmuskel-, Milz- und Knochenmarkproben eingesetzt. 100 mg des entsprechenden Gewebes werden mit einem Skalpell zerkleinert, in ein 50 ml Röhrchen gegeben, eventuell vorher in einem 1,5 ml Tube zermörsert. Nun werden 3 ml Cell Lysis solution dazu gegeben und für 30 sec gevortext. Die Röhrchen werden für 1 h in ein 65 °C warmes Schüttelbad gestellt. Anschließend wird erneut für 30 sec gevortext. Das Gewebe sollte sich jetzt aufgelöst haben. Die Proben sollten auf Raumtemperatur abgekühlt sein bevor sie mit 1 ml Protein precipitation solution versetzt werden. Es wird wieder für 30 sec gevortext, bevor die Proben bei 2.000 g für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert werden. Die Proteine sollten jetzt ein festes Pellet gebildet haben, ansonsten ist der letzte Schritt zu wiederholen. Der Überstand wird in ein 15 ml Röhrchen, in dem sich bereits 3 ml 100 %-iges Isopropanol befinden, überführt. Durch leichtes Schütteln wird gemischt. Es folgt eine fraktionierte Zentrifugation, wie in 2.2.1 beschrieben, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen, bis alles verbraucht ist. Der Überstand wird abgegossen, 500 µl 70 %-iges Ethanol zupipettiert, das ganze kurz umgedreht, um dann 5 min abzentrifugiert zu werden. Der Überstand wird verworfen. Das Eppendorfgefäß wird über Kopf entweder bei Raumtemperatur 1 h oder im Brutschrank bei 60 °C getrocknet. 150 µl DNA Hydration solution werden hinzu gegeben. Abschließend erfolgt die Inkubierung bei entweder 65 °C für 1 h oder über Nacht bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank.

### **3.2.3 Super Quick Gene (Immucor) zur DNA-Gewinnung aus Blut**

1-2 ml Vollblut werden in ein Reaktionsröhrchen (50 µl) überführt, mit RBC (red blood cell buffer) auf 40 µl aufgefüllt und gevortext. Bis zur vollständigen Lyse der Erythrozyten werden die Proben für 1 h in den Kühlschrank (8 °C) gestellt. Anschließend werden sie 10 min bei 4.300 upm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 20 µl RBC

resuspendiert und wiederum für 10 min bei 4.300 upm zentrifugiert. Der Überstand wird abermals dekantiert. Nun erfolgt das Ganze noch einmal mit 10 ml RBC. Das Pellet sollte jetzt weiß sein. 1,5 ml White blood cell buffer werden hinzu gegeben. Die Proben werden gevortext und für 30 min in ein 56 °C heißes Schüttelbad gestellt. Nun wird wieder 30 sec gevortext. Es werden 500 µl Protein precipitating reagent, sowie 200 µl SDS hinzu pipettiert, gevortext für 30 sec. Dann werden die Röhrchen für 15 min ins Wasserbad (56 °C) gestellt. Folgend wird für 20 min bei 5000 upm zentrifugiert. Wenn der Überstand weitgehend klar ist, wird er in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Mit eiskaltem Ethanol absolut werden die Proben auf 7 ml aufgefüllt und dann leicht geschüttelt. Die DNA sollte jetzt als Fädchen/Flocke sichtbar werden. Sie wird mit einem Glasspatel heraus geangelt und in 70%-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wird in 500 µl Bidest gelöst. Auch hier kann bei Bedarf der Thermoschüttler (37 °C) zur vollständigen Lösung eingesetzt werden.

#### **3.2.4 Aus Blut mittels Aussalzungsmethode nach Walsh et al**

4 ml Lysispuffer werden in ein 50 ml Reaktionsröhrchen pipettiert, auf 40 ml mit Bidest aufgefüllt und anschließend mit 1-2 ml Vollblut beschickt. Um die Zellen zu lysieren, werden die Röhrchen (-20 °C ) für 20-30 min bei -20 °C gekühlt, bis der Inhalt klar-rot ist. Jetzt wird für 10 min bei 2.500 upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen. Die Röhrchen werden mit der Öffnung nach unten auf Einmaltücher gestellt. Sämtliche Flüssigkeitsrückstände sollten unter Verschonung des Pellets mit der Wasserpumpe abgesaugt werden. Auf das Pellet wird nun jeweils 10 ml PBS-Puffer (pH 7,5) gegeben. Dann wird kräftig von Hand geschüttelt. Es folgt eine Zentrifugation bei 2.500 upm für 10 min. Der Überstand wird wieder abgegossen und sonstig verbliebene Flüssigkeitsrückstände mit der Wasserpumpe abgesaugt. Das verbliebene Pellet sollte jetzt weiß sein. Es wird mit 600 µl kaltem TEN-Puffer unter Schütteln gelöst. Dazu werden 6 µl 20%-iges SDS gegeben. Es erfolgt ein leichtes Schütteln zur Lyse der kernhaltigen Zellen. Zur Inaktivierung von Proteinen werden jeweils 12 µl

Proteinase-K (= 5 µg/ml) hinzu pipettiert. Es folgt ein leichtes Schwenken der Probe, bevor die Proben über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert werden.

Am nächsten Tag werden die Proben mit 240 µl gesättigter NaCl- Lösung versetzt, 15 sec kräftig geschüttelt und für 15 min bei 5.600 upm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, das Sediment verworfen. Auf die NaCl-DNA-Lösung werden 1,72 ml Ethanol absolut pipettiert. Die Proben werden vorsichtig kurz geschwenkt. Nach circa 1-2 min sollte die DNA ausfallen. Der DNA-Faden wird mit einem Glasspatel heraus geangelt und in eiskaltem (-20 °C) Ethanol (70 %) gewaschen. Der Ethanol muss verdunstet sein bevor die DNA in 100 µl TE-Puffer, der in Eppendorfgefäßen bereitgestellt worden ist, gelöst wird. Die Eppendorfgefäße werden für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden sie bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### **3.2.5 Nucleo Spin Blood Quick Pure (Machery-Nagel)**

200 µl Blut und 25 µl Proteinase K werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Nach der Hinzugabe von 200 µl BQ1 wird 10-15 sec gevortext. Für 10 min werden die Proben bei 70 °C inkubiert und 200 µl Ethanol absolut hinzu gegeben. Es wird kurz gevortext. Nach dem Abkühlen der Proben werden sie in die Nucleo spin Blood Quick Pure Röhrchen überführt und für 1 min zentrifugiert. Anschließend werden diese in ein neues Sammelgefäß überführt. Es folgt ein Waschschrift mit 320 µl BQ-2-Puffer mit 3 minütiger Zentrifugation. Das Sammelgefäß wird verworfen und das Nucleo spin Blood Quick Pure Röhrchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. 50 µl elution buffer BE werden hinzupipettieren. Die Proben werden für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Das Eluat enthält die DNA.

### **3.3 Überprüfung von DNA-Quantität und Qualität**

#### **3.3.1 Photometrische Messung**

Zur photometrischen Messung von DNA wird ein Photometer mit Deuteriumlampe verwendet (Photometer, Lange). Hierbei werden zwei Messungen der gleichen Probe bei 260 nm und bei 280 nm vorgenommen. Die Extinktion bei 260 nm Wellenlänge gibt den Gehalt an doppelsträngiger DNA wieder ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm sollte zwischen  $r = 1,6$  bis  $1,8$  liegen. Er spiegelt die Reinheit der DNA-Lösung wieder. Ist  $r < 1,6$  liegt häufig eine Proteinverunreinigung vor.

Zur Messung wurden  $10 \mu\text{l}$  der DNA-Probe mit  $490 \mu\text{l}$  Aqua bidest versetzt. Der Leerwert (Aqua bidest) wird subtrahiert.

#### **3.3.2 Gelelektrophorese**

In einer Gelelektrophorese werden die DNA-Moleküle sowohl nach Größe als auch nach Ladung aufgetrennt. Die Moleküle wandern entlang eines elektrischen Feldes zur Anode, da die DNA-Seitenketten selbst negativ geladen sind. Als Matrix werden hier horizontal angelegte Agarosegele verwendet. Sie hindern auf Grund ihrer Porengröße große Fragmente am schnellen Wandern. Abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente und damit der erwünschten Porengröße werden 1 % bzw. 3 %-ige Agarosekonzentrationen verwendet. Agarose selbst ist ein aus roten Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid. Wird es mit Wasser oder Puffer, hier 1x TBE, aufgeköcht, geliert es beim Abkühlen.

Um einen kontinuierlichen Stromfluss zu erreichen, wird das Gel mit 1x TBE-Puffer über schichtet. Die DNA-Fragmente werden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert in den DNA-Doppelstrang und wird vor dem Gießen dem Gel beigefügt. Den Proben selbst wird der Farbstoff Bromphenolblau ( $5 \mu\text{l}$  Probe +  $5 \mu\text{l}$  Farbe) beigefügt. Bromphenolblau ist stark niedermolekular und wandert aus

diesem Grund schneller als die DNA-Fragmente. Es zeigt so die Lauffront an. Zur Kontrolle und Größeneinordnung der Fragmente wird ein Größenstandard (HL 1/4, Bioline) mit aufgetrennt. Die Elektrophorese wird bei 80 V durchgeführt bis die Lauffront das Ende der Laufstrecke erreicht hat.

### **3.4 PCR -Polymerase Chain Reaktion allg.**

Die PCR wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt. Sie ist heute die Standardmethode zur Invitro-Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten. Das Prinzip beruht auf einer Denaturierung der von Watson und Crick (1953) postulierten Doppelhelixstruktur der DNA bei 90 °C, einem anschließenden Anheften von Oligonucleotiden an den 5'-Enden und einer Komplettierung der Einzelstränge zu Doppelsträngen. Benötigt werden neben dem Template spezifische Primer, dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphate), thermostabile DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub>, ein Puffer und PCR-Beschleuniger, wie z.B. DMSO.

### **3.5 Amplifikation von mtDNA in einer Duplex-PCR**

Bei dieser Art der PCR werden jeweils zwei Primerpaare eingesetzt. So können Fragmente unterschiedlicher Genloci gleichzeitig amplifiziert und verglichen werden. Es sind zwei verschiedene Duplex-PCRs zur Anwendung gekommen. In dem einen PCR-Verfahren werden gleichzeitig nukleäre DNA-Fragmente und Wildtyp-mtDNA-Fragmente detektiert, im anderen PCR-Verfahren werden solche mtDNA-Fragmente, in denen die 4977 bp- Deletion (=dmtDNA) vorliegt, und zusätzlich das wtmtDNA-Fragment vervielfältigt.

Die Primer L15/H16 dienen der Darstellung eines 260 bp großen Fragmentes aus dem ND1-Gen der mitochondrialen Wildtyp-DNA (von Wurmb-Schwark et al., 2004):

L15: 5` -AAC ATA CCC ATG GCC AAC CTC CTA C- 3`

H16: 5` -CAT AGT AGA AGA GCG ATG GTG AGA G-3`

Das  $\beta$ -Globin Primerpaar ergibt ein 164 bp großes nukleäres Amplifikat:

$\beta$  I : 5` -ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3`

$\beta$  II: 5` -GTC TCC TTA AAC CTG TCT TG-3`

Durch die Primer L35/H45 wird das 4977-deletionsspezifische Fragment erfasst, welches nur amplifiziert werden kann, wenn die spezifische Deletion vorliegt, da die Primer nahe genug beieinander liegen („short cycle PCR“). Das Fragment hat eine Länge von 238 bp. Liegt die Deletion nicht vor, sind die Primer, die den Bereich der Deletion flankieren, zu weit voneinander entfernt, als dass ein spezifisches PCR-Produkt hergestellt werden könnte.

L35: 5` -CTC TAG AGC CCA CTG TAA AGC TAA C-3`

H45: 5` -CCT GTG AGG AAA GGT ATT CCT GCT A-3`

Der Primer wurden im Vorfeld angesetzt. Sie setzen sich aus jeweils 10  $\mu$ l Vorwärts- und Rückwärtsprimer zusammen, die dann portionsweise eingefroren werden, um eine Kontamination zu vermeiden. Lediglich das Primerpaar L35/H45 wird pur verwendet, die Übrigen werden vor der Verwendung 1:10 verdünnt. Das eingesetzte Volumen beträgt jeweils 12,5  $\mu$ l, wobei 7,5  $\mu$ l dem Mastermix entstammen. Der Mastermix setzt sich zusammen aus:

10 x Immobuffer (Bioline),  $MgCl_2$  (Bioline), dNTPs (Bioline), DMSO (Obiogene), Immolase (Bioline), Aqua bidest, sowie jeweils zwei Primerpaare L15/H16,  $\beta$ -Globin bzw. L35/H45. Die genauen PCR-Parameter sind in den Tabellen 5 und 6 im Anhang zu entnehmen.

Der Mastermix wird in die 0,2 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) gegeben und DNA in gewünschter Konzentration zupipettiert. Es ergibt sich ein Reaktionsvolumen von 12,5  $\mu$ l.

Nach Abschluss dieser Arbeiten werden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt (Gene Amp® PCR System 2700, Applied Biosystems). Das entsprechende Protokoll umfasst 35 Zyklen (siehe Tab. 4 im Anhang).



### **3.6 Analyse der PCR-Produkte**

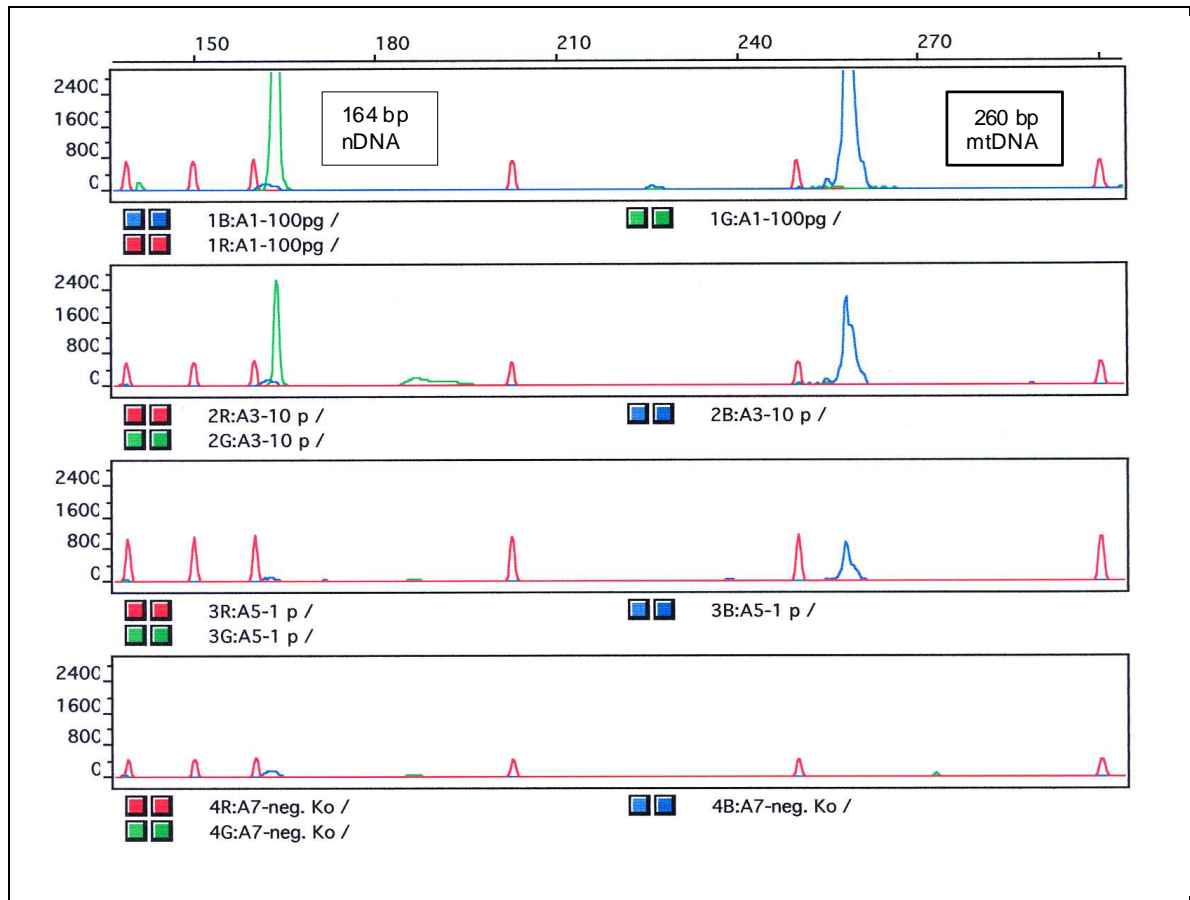
Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt mittels Elektrophorese, entweder, wie oben beschrieben, als Gelelektrophorese mit einem 1 %-igen Agarosegel oder mit Hilfe einer lasergestützten Kapillarelektrophorese.

### **3.7 Kapillarelektrophorese**

Die automatische Fragmentanalyse ist das Mittel der Wahl, um nicht nur die amplifizierten Fragmente qualitativ aufzudecken, sondern sie vielmehr auch relativ quantitativ einzuordnen. Verwendung fand der ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Er arbeitet mit einer Vielfarbfluoreszenzmarkierung und ist so in der Lage, Aussagen über Größe, Sequenz und die Menge an Nukleinsäuren zu geben. Die gesuchten Fragmente werden mit Hilfe der farbmarkierten Primer als verschiedenfarbige Peaks graphisch dargestellt.

Auch hier wird zur Vorbereitung ein Mastermix hergestellt. Er setzt sich je Probe aus 11,8 µl Formamid und 0,2 µl Rox 500-Standard zusammen. Der Mastermix wird auf die 0,5 ml Genetic Analyzer Sample Tubes (Applied Biosystems) verteilt. Sie werden im Anschluss mit Gummisepta (Genetic Analyzer Septa, Applied Biosystems) verschlossen. In jedes Gefäß wird 1 µl des zu analysierenden PCR-Produktes pipettiert. Die Tubes werden in den 48-well tray gestellt. Nun erfolgt die automatische Analyse.

Die Auswertung der Fragmentanalyse übernimmt die GeneScan® Analysis Software Version 3.1.2 (Applied Biosystems). Die Zuordnung der Fragmentgröße wird durch den Größenstandard ROX 500 möglich, der Fragmente definierter Größe enthält (Abb. 2). Somit erfolgt keine absolute Quantifizierung sondern eine relative Quantifizierung an Hand des Größenstandards. Sollen nun unterschiedliche Läufe miteinander verglichen werden, so ist dies nur indirekt also relativ an Hand des Größenstandards ROX 500 möglich.



**Abbildung 2: Ausdruck des ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyser einer Duplex-PCR unter Einsatz verschiedener DNA-Mengen.** Größenstandard ROX 500, blau: 260 bp mtDNA-Fragment und 238 bp dmtDNA-Fragment, grün: 164 bp nDNA. Betrachtet werden die Unterkurvenflächen zur relativen Quantifizierung von DNA/mtDNA.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 DNA Extraktion aus den verschiedenen Geweben

Es kamen mehrere Extraktionsverfahren zum Vergleich der Ergiebigkeit, der Anwenderfreundlichkeit und der benötigten Zeit zur Anwendung, um für die jeweiligen Gewebe die beste Methode einsetzen zu können:

#### 4.1.1 DNA-Extraktion aus Blut

Die Extraktion aus Leichenblut erfolgte, wie in den Punkten 2.2.2 -2.2.4 beschrieben mittels zweier Kits (Super QuickGene Kit von Immucor und dem Nucleo Spin Blood Quick Pure (von Machery-Nagel) und mittels Aussalzung. Das Aussalzen nach Walsh et al. war eindeutig die kostengünstigste aber auch zeitintensivste Methode.

Die Methoden unterscheiden sich insbesondere durch die einzusetzende Probenmenge bei ähnlichen Pelletgrößen. Es ergeben sich so unterschiedliche Ergiebigkeiten bezüglich der DNA-Ausbeute.

Aussalzen:	4 ml Vollblut
Immucor Kit:	1-2 ml Vollblut
n. Machery-Nagel:	200 µl Vollblut

Das Vorhandensein von DNA wurde anschließend durch photometrische Messung überprüft. Als optimaler Wert für die Proteinverunreinigung gilt 1,8. Schon während des Extraktionsvorganges kann eine Aussage über die Qualität der DNA gemacht werden, da hoch-molekulare DNA bei Zugabe von eiskaltem Ethanol absolut als Fadenknäuel ausfällt und so mittels einer Glasöse geborgen werden kann. Dies war in ~ 90 % der so gewonnenen Proben der Fall. Im Anschluss erfolgte eine quantitative und auch qualitative Überprüfung mittels 1 %-iger Agarosegelelektrophorese. Zusammengefasst konnten 177 von den 200 eingesetzten Proben erfolgreich aufgearbeitet werden.

---

#### **4.1.1.1 DNA-Extraktion aus Milz, Knochenmark und Skelettmuskulatur**

Hier kamen zwei verschiedene Extraktionsverfahren zur Anwendung:

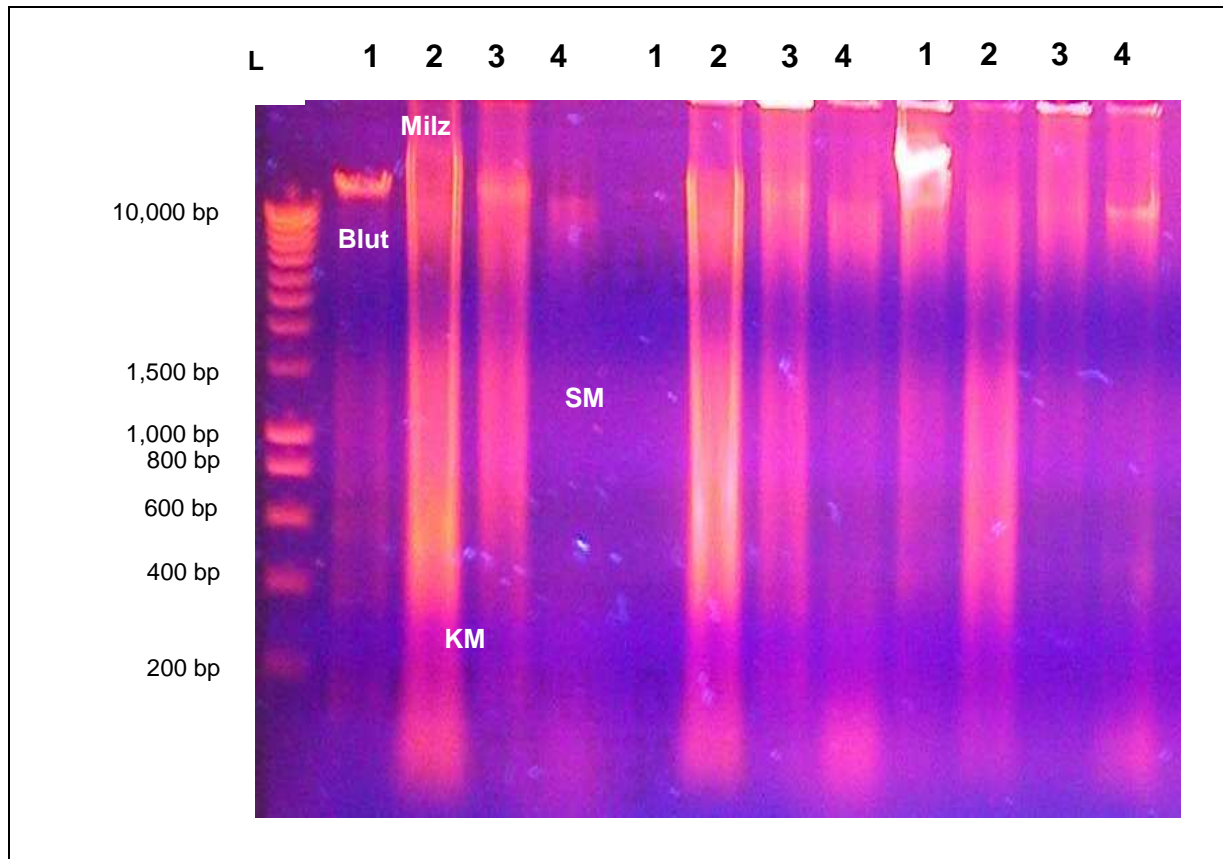
- Super Quick Gene Kit von Immucor
- Genomic DNA Purification Kit von PUREGENE®

Schwierigkeiten ergaben sich hier vor allem bei der Extraktion aus Knochenmark, da die beiden Systeme nicht in der Lage waren den hohen Fettanteil zu eluieren. Dieser Fettanteil zeigte allerdings keinen negativen Einfluss auf die folgende PCR. Es erfolgten dennoch zum Teil mehrere Waschungen mit Ethanol. Die Qualität und Quantität der DNA aus Knochenmark war starken Variationen unterworfen (gelblich bis bräunliche Verfärbungen des DNA-haltigen Überstandes).

Auch das Pellet der DNA aus der Milz war häufig noch rötlich-braun verschmutzt, da sich hier offenbar die Überreste der Reticulumzellen nicht auf Anrieb entfernen ließen. Nach weiteren Waschungen konnte aber auch hier ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden.

Das DNA-Pellet aus Skelettmuskel hatte ein kleineres Volumen als die der übrigen, war aber makroskopisch von vornherein rein. Auch hier erfolgte eine qualitative und quantitative Überprüfung mittels 1 %-iger Agarosegelelektrophorese.

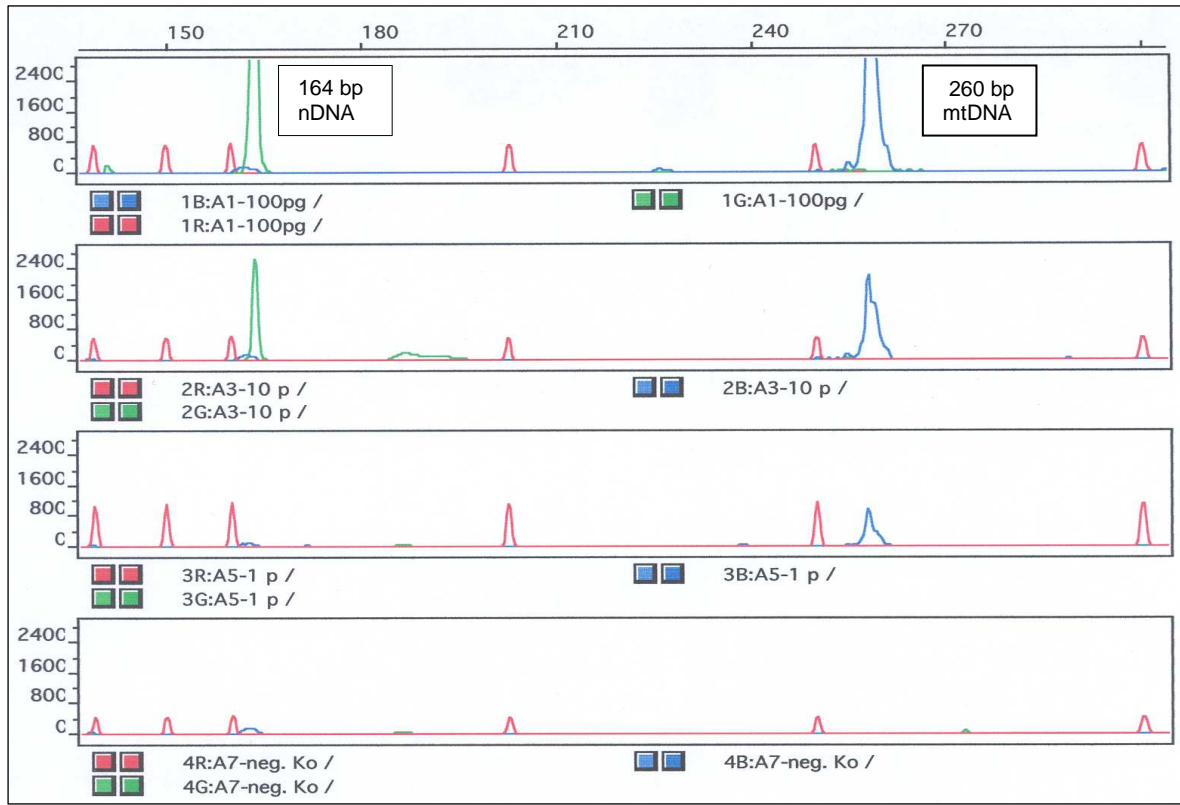
Es zeigten sich für die jeweiligen Gewebe spezifische Degradationsmuster der DNA (Abb. 3). So ist in Blut- und Skelettmuskel-Proben durchgängig hochmolekulare DNA zu finden. Während sich in Milz- und Knochenmark-Proben zusätzlich sehr viel degradierte DNA als Schmierbanden darstellt.



**Abbildung 3: Aggarosegel von extrahierter DNA aus Milz, Blut, Knochenmark und Skelettmuskel bei Personen unterschiedlichen Alters.** Jeweils 5  $\mu$ l Gesamt-DNA pro Probe von drei verschiedenen Personen wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. L=HL I Leiter (Bioline); 1: DNA aus Blut, 2 : DNA aus Milz, 3: DNA aus Knochenmark, 4: DNA aus Skelettmuskel.

#### 4.2 Amplifikation von nukleärer und mitochondrialer DNA

Sowohl nukleäre als auch mitochondriale DNA waren aus allen vier Geweben amplifizierbar. Es stellte sich heraus, dass die PCR-Produkte je 1:10 verdünnt in die Fragmentanalyse eingesetzt werden mussten, um relativ quantitative Werte zu erhalten. Unverdünnt wären die Signale zu stark und damit aus dem relativen Messbereich des Gerätes, da unter anderem die eingesetzte Duplex – PCR sehr sensitiv ist (Abb. 4).



**Abbildung 4: Elektropherogramm nach Kapillarelektrophorese zum Nachweis von nukleärer und mtDNA in einer Duplex-PCR:** Verdünnungsreihe zur Optimierung der einzusetzenden Probemenge; rot: Größenstandard ROX 500, blau: mt-DNA-Fragment, grün: nukleäres Fragment ( $\beta$ -Globin)(vgl. Abb. 2)

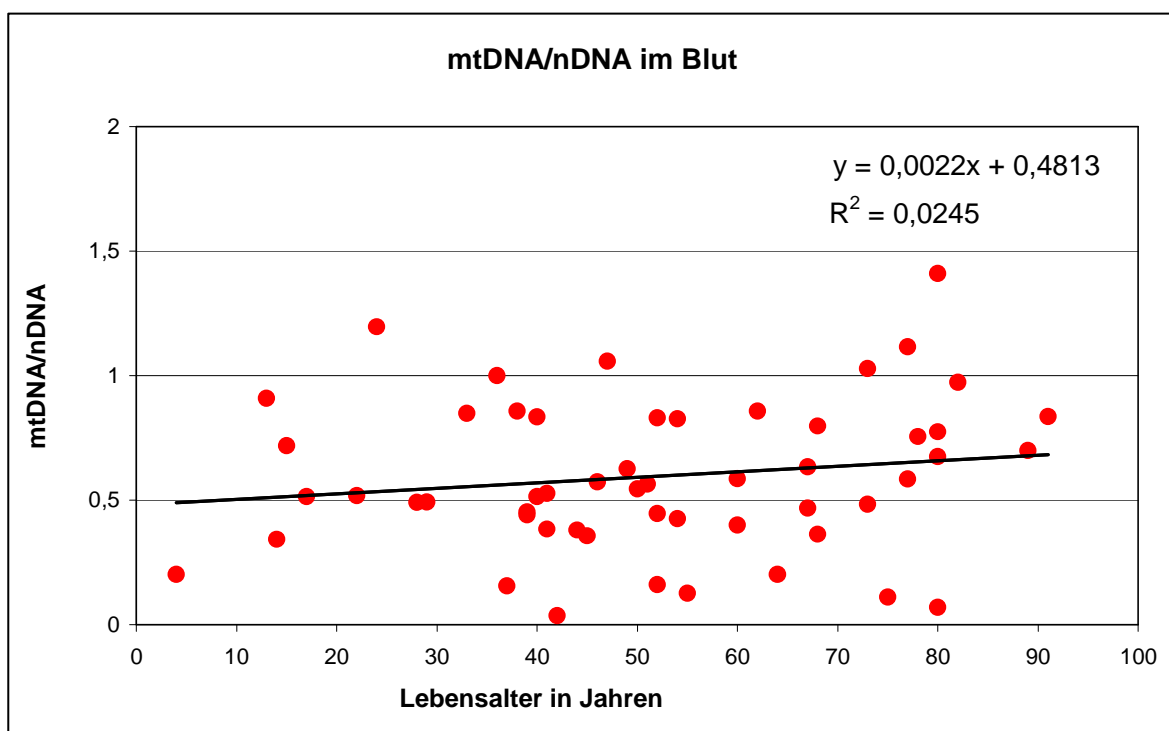
#### 4.2.1 Amplifizierbarkeit von nukleärer und mitochondrialer DNA nach verschiedenen Extraktionsverfahren

Die Extraktionsverfahren selbst hatten keinen entscheidenden Einfluss auf die Amplifizierbarkeit der DNA. Selbst DNA aus Knochenmark mit noch einer makroskopisch sichtbaren Verunreinigung durch Fett ließ sich problemlos amplifizieren. Sowohl das  $\beta$ -Globin-Fragment als Teil der Kern-DNA als auch die mitochondriale DNA waren in allen Geweben gut nachweisbar. Für alle Gewebe schwankt das Verhältnis von mitochondrialer DNA zu Kern-DNA zwischen 0 und 2. Es ließ sich somit in einigen Proben (für die der Wert nahe 0) keine oder nur wenig mitochondriale DNA im Verhältnis zur Kern-DNA nachweisen. In anderen

Fällen war es ferner so, dass der Anteil der mtDNA den der nDNA überstieg. Es zeigt sich aber, dass diese Ergebnisse nicht von der Art der Extraktionsmethode abhängig sind.

#### 4.2.1.1 Im Blut

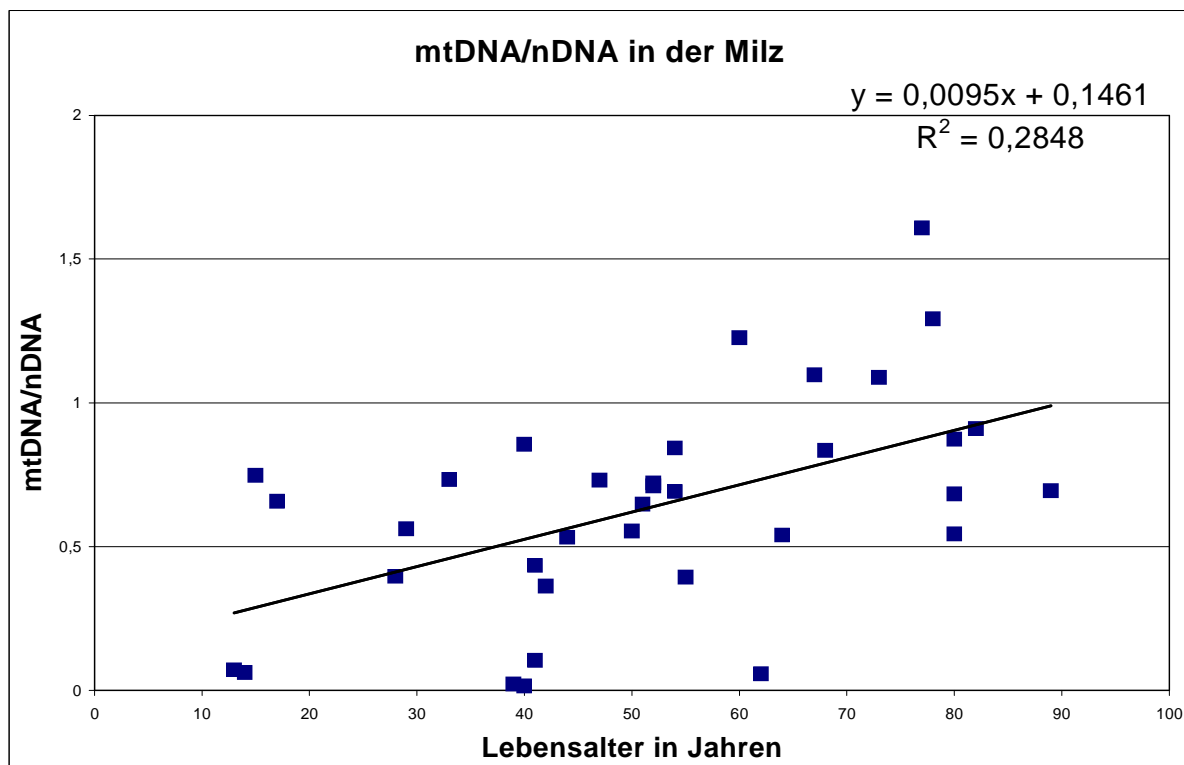
Im Blut macht die mitochondriale DNA einen kleineren Teil der gesamten DNA im Vergleich zu den anderen Geweben aus. Weiterhin ist ein jedoch nur ein geringer Anstieg des Verhältnisses von mtDNA zur nDNA mit zunehmendem Lebensalter des Individuums zu beobachten. Dies wird durch die Gerade in Abbildung 5 zum Ausdruck gebracht. Das heißt es gibt keine Abhängigkeit zwischen der relativen Menge der mtDNA im Blut und dem Lebensalter.



**Abbildung 5: Relative Menge der mitochondrialen DNA im Blut im Verhältnis zur Kern-DNA.** Die Gesamt-DNA von 54 Personen wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Fläche unter der Kurve (ermittelt mit der Genescan Software) für die mitochondriale DNA wurde zu der der Kern-DNA ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.

#### 4.2.1.2 Im Milzgewebe

Im Milzgewebe ist eine Zunahme mit zunehmendem Lebensalter deutlicher zu finden. Die Korrelation zwischen Lebensalter und dem Verhältnis von mtDNA zu nDNA ist größer ( $R^2=0,2848$ ), jedoch ist auch diese nicht signifikant. Hier wurden wie auch vom Knochenmark und Skelettmuskel Proben von 36 Individuen untersucht, die durchgängig erfolgreich und in ausreichender Menge mit einer Extraktionsmethode aufgearbeitet wurden.

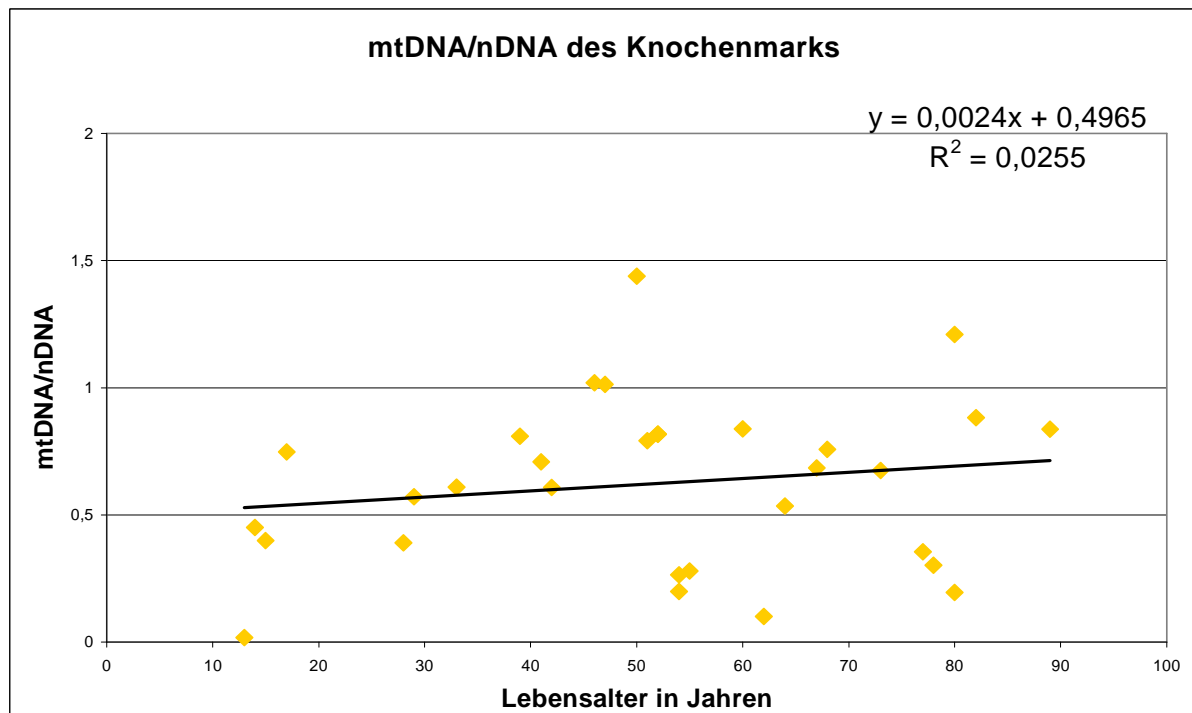


**Abbildung 6: Relative Menge der mitochondrialen DNA der Milz im Verhältnis zur Kern-DNA.** Die Gesamt-DNA von 36 Personen (je extrahiert mit dem Immucor Kit) wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Fläche unter der Kurve (ermittelt mit der Genescan Software) für die mitochondriale DNA wurde zu der der Kern-DNA ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.



#### 4.2.1.3 Im Knochenmark

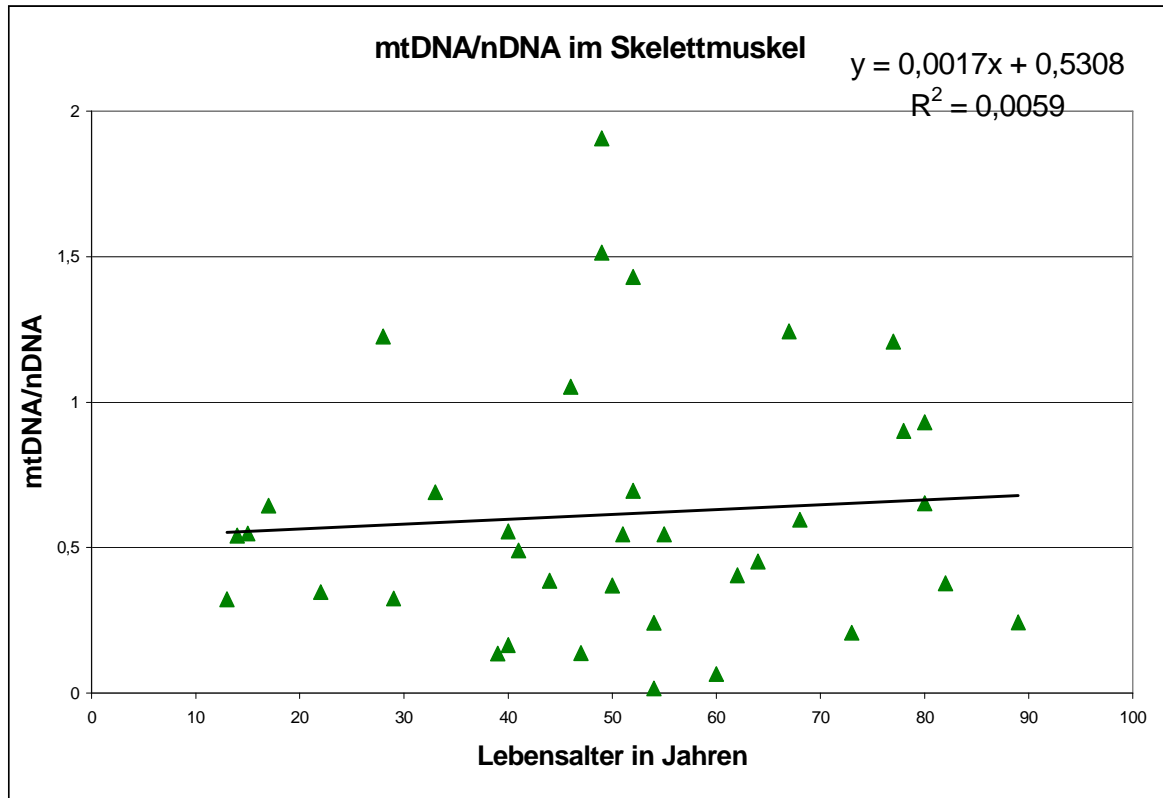
Im Knochenmark zeigte sich bei jedem untersuchten Individuum sowohl mitochondriale, als auch nukleäre DNA. Mit zunehmendem Alter kommt es im Gegensatz zum Milzgewebe nur zu einer geringen relativen Zunahme des Verhältnisses von mtDNA zur nDNA.



**Abbildung.7: Relative Menge der mitochondrialen DNA im Knochenmark im Verhältnis zur Kern-DNA.** Die Gesamt-DNA von 36 Personen wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Fläche unter der Kurve (ermittelt mittels Analyser) für die mitochondriale DNA wurde zu der der Kern- DNA ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.

#### 4.2.1.4 Im Skelettmuskelgewebe

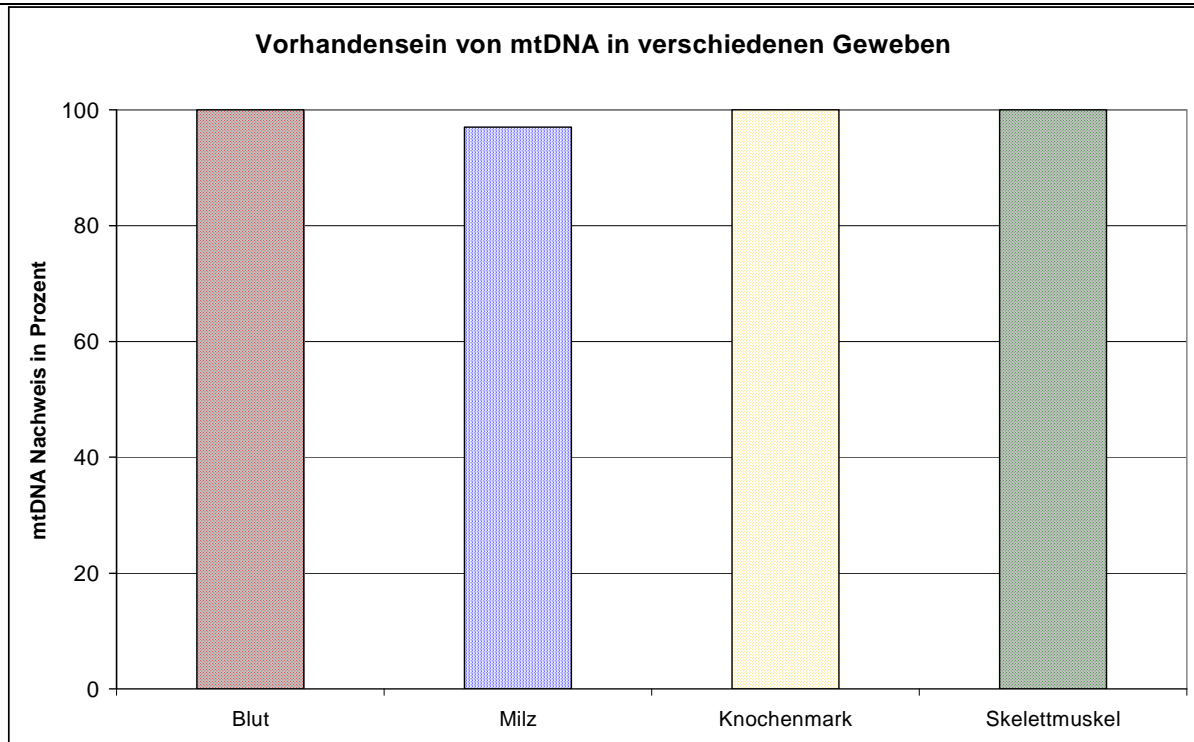
Wie schon durch vorherige Studien bekannt, konnte im Skelettmuskel sowohl mitochondriale als auch nukleäre DNA gefunden werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Geweben ist das Verhältnis von mtDNA zu nDNA in Bezug auf das Lebensalter nahezu konstant, betrachtet man die Abbildung 8. Jedoch gibt es hier starke interindividuelle Schwankungen, welche eine breite Streuung und so eine nur geringe Korrelation ergeben.



**Abbildung.8: Relative Menge der mitochondrialen DNA im Skelettmuskel im Verhältnis zur Kern-DNA.** Die Gesamt-DNA von 36 Personen wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Fläche unter der Kurve (ermittelt mittels Analyser) für die mitochondriale DNA wurde zu der der Kern- DNA ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.

#### 4.3 Amplifizierbarkeit von mitochondrialer und nukleärer DNA in verschiedenen Geweben

In allen Geweben ließ sich zu fast 100 Prozent mitochondriale DNA nachweisen, wenn nukleäre DNA zu extrahieren war (Abb. 9). Doch unterscheidet sich die Menge an mtDNA zur nukleären DNA zwischen den einzelnen Geweben (vgl. Abb.5 -8). Im Blut war der Anteil an mtDNA zur nDNA am geringsten.



**Abbildung 9: Gewebespezifische Verteilung von mtDNA in Prozent im Bezug auf die nukleäre DNA.** Schematische Darstellung der relativen Menge der mtDNA nach Duplex-PCR.

#### 4.4 Amplifikation von spezifisch 4977 bp deletierter mtDNA

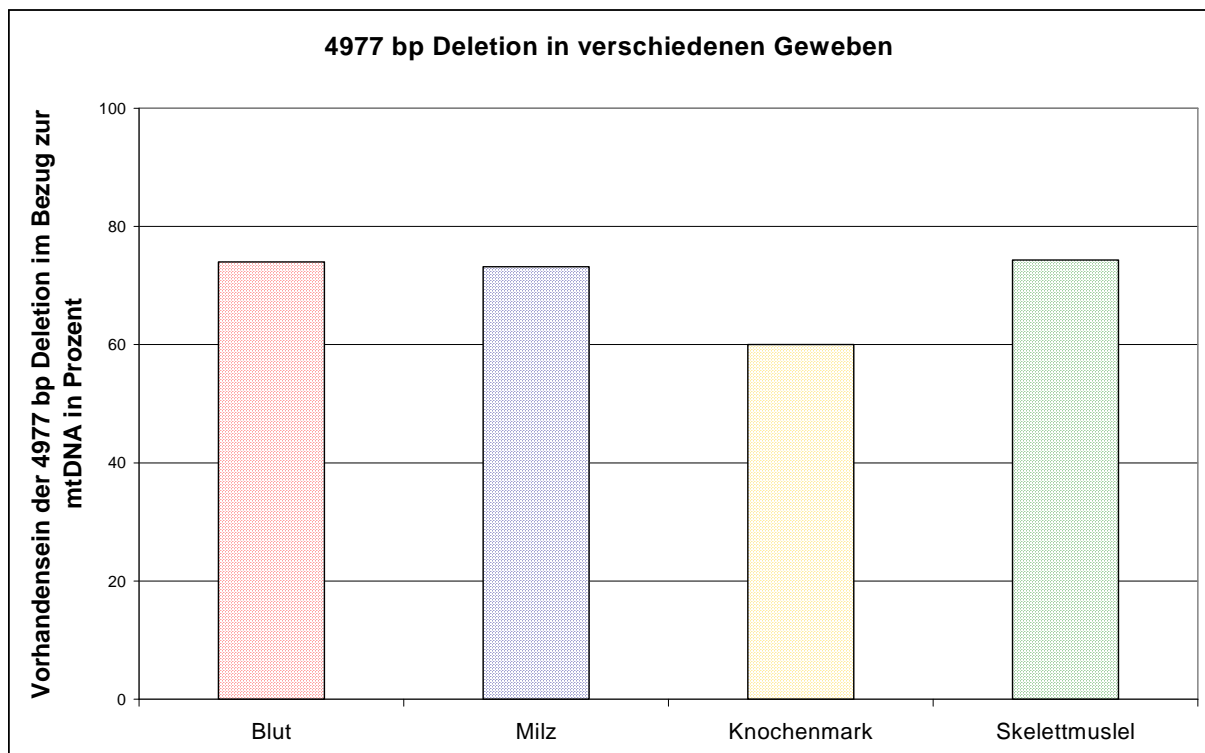
In allen Geweben ließ sich wtDNA sowie auch deletierte mitochondriale DNA nachweisen. Zunächst musste die Methode optimiert werden, indem verschiedene Verdünnungsreihen eingesetzt wurden. Zum einen wurden Verdünnungsreihen der extrahierten DNA vor der PCR verwendet, zum anderen wurden die PCR-Produkte pur, 1:10 und 1:100 verdünnt.

PCR-Produkte verschiedener Verdünnungen wurden zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle auf 3%-ige- Agarosegele aufgetragen.

Die verdünnten PCR-Produkte wurden anschließend zusätzlich in einem ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyser analysiert. Es wurden 1 µl, 2,5 µl und 5 µl der Verdünnung (1:100 und selten zu Testzwecken auch 1:10) eingesetzt. Es handelt sich um eine sehr sensitive Methode des DNA-Nachweises, die in Kurvenform zur Darstellung kommt. Auch hier erfolgte die relative Quantifizierung mittels der Flächen unter der Kurve, die durch die GeneScan<sup>®</sup> Analysis Software automatisch errechnet wurde. Ein zu hoher DNA-Anteil (Einsatz pur oder 1:10) führte zu Messungenauigkeiten

bzw. -Fehlern, da das Gerät oberhalb einer Quantifizierungskurve von 5.000 Einheiten nicht mehr reproduzierbar quantifiziert.

In 60 – 80 % der eingesetzten Proben ließ sich die 4977 bp Deletion nachweisen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit dem Blutumsatz beteiligten Geweben (Abb. 10).



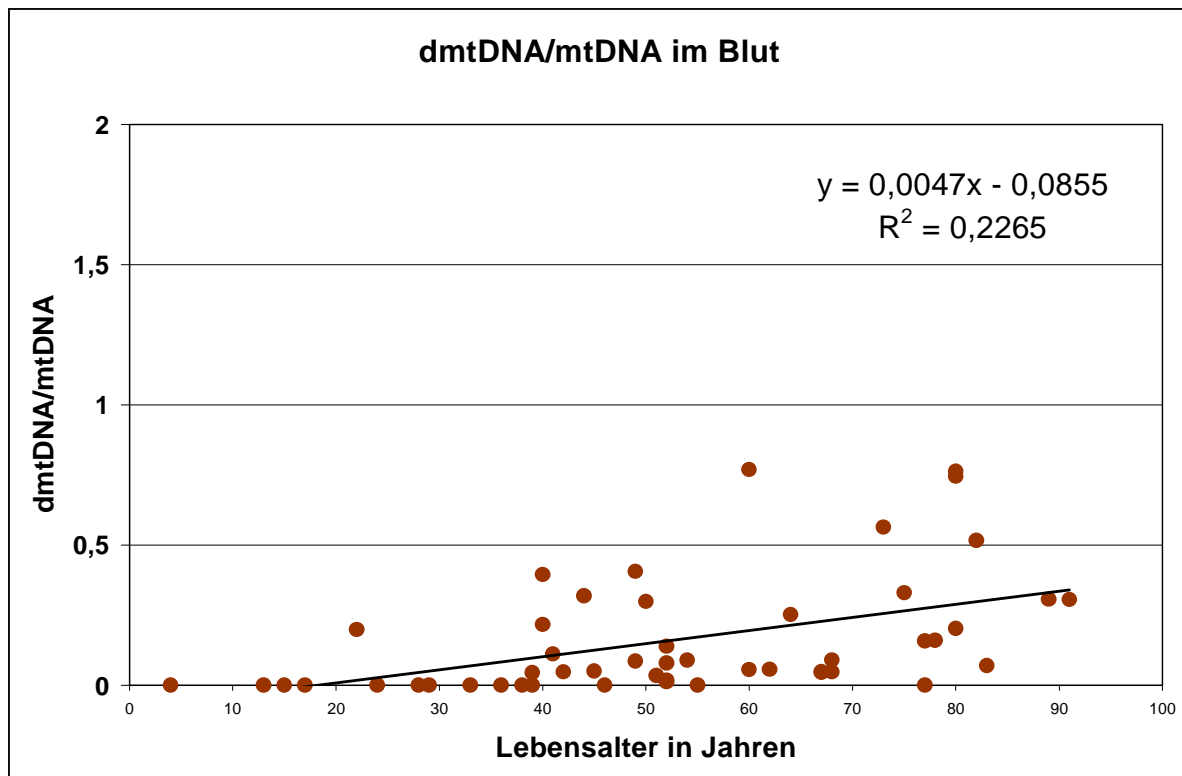
**Abbildung 10: Anzahl der Proben in Prozent in denen sich die 4977 bp Deletion nachweisen ließ im Verhältnis zur Anzahl derer in denen sich mitochondriale DNA nachweisen ließ in verschiedenen Geweben.**

#### 4.4.1 Altersabhängigkeit der 4977 Deletion

Die 4977 bp Deletion ließ sich in allen Altersklassen nachweisen, auch schon unterhalb des 20. Lebensjahres. Mit zunehmendem Alter war eine Erhöhung der relativen Menge dmtDNA zu beobachten.

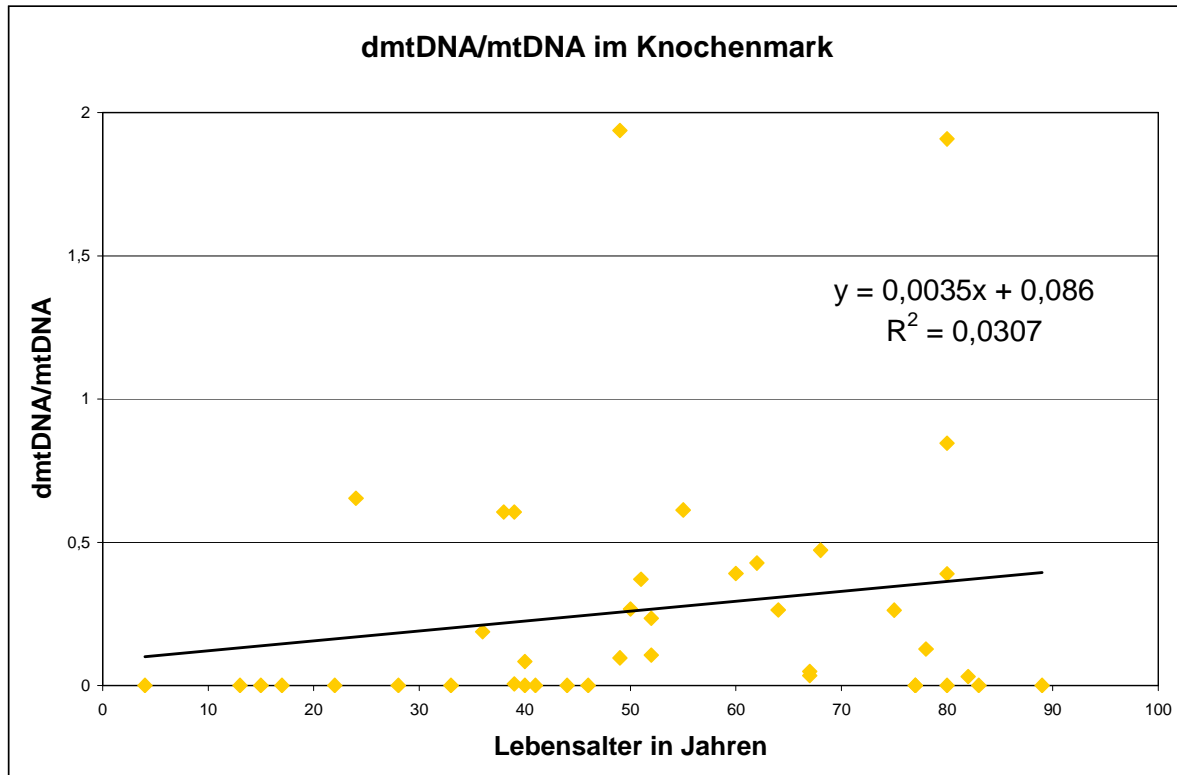
Im Blut ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0,2265$  und somit eine nur geringe Abhängigkeit zwischen Alter und Auftreten der 4977 bp Deletion. Ab dem 4. Lebensjahr war die Deletion nachweisbar (Abb. 11).

Jedoch ist die Streuung zu stark, so dass der Umkehrschluss nicht zulässig ist und damit ein positiver prädiktiver Wert keine Aussagekraft hätte.



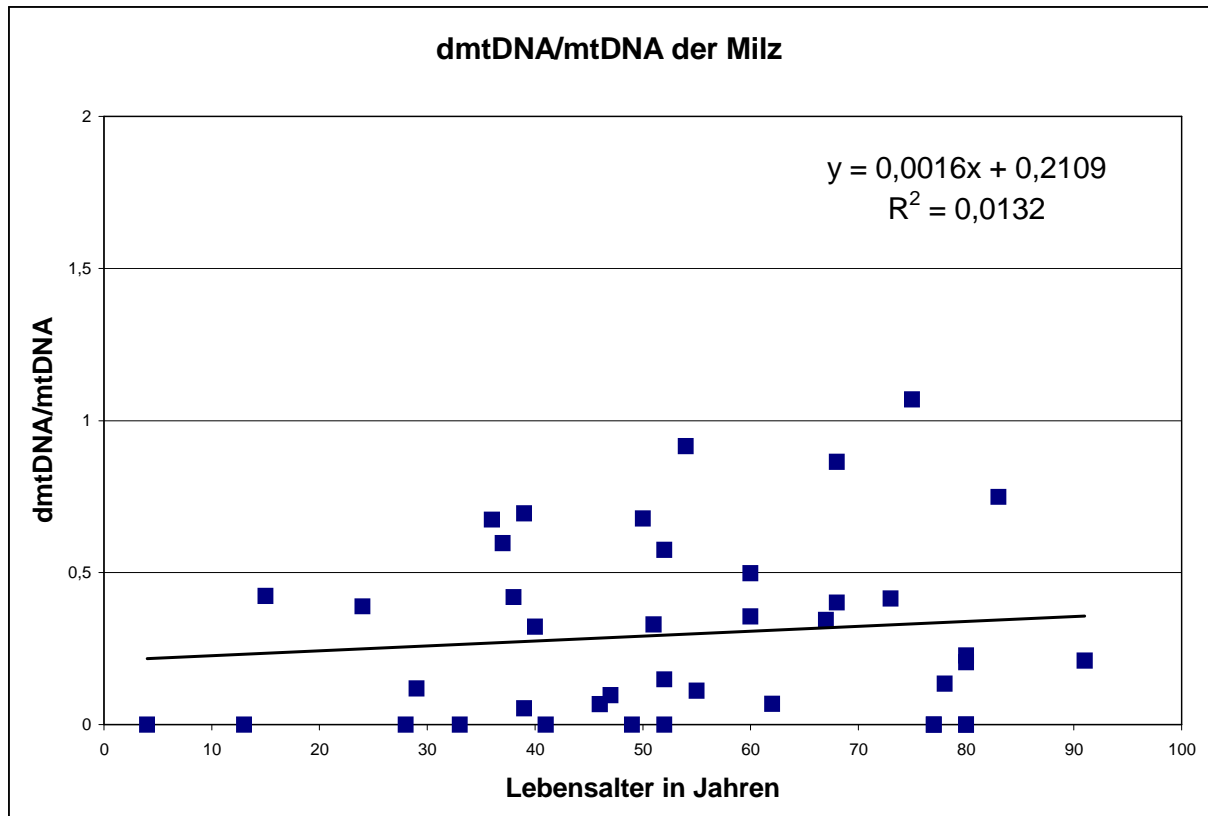
**Abbildung 11: Relative Menge der 4977 bp Deletion im Blut.** Die Gesamt-DNA von 51 Personen im Alter von 4 – 91 Jahren wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.

Keine Korrelation fand sich für das Knochenmark ( $R^2 = 0,0307$ ). Schon in jungen Jahren ist ein vermehrtes Auftreten der 4977 bp Deletion zu beobachten. Diese war ab dem 13. Lebensjahr (vgl. Abb. 12) zu detektieren. Insgesamt trifft man im Knochenmark auf einen geringeren Anteil an deletierter DNA. Ein signifikanter Unterschied zum Blut ist nicht festzustellen.



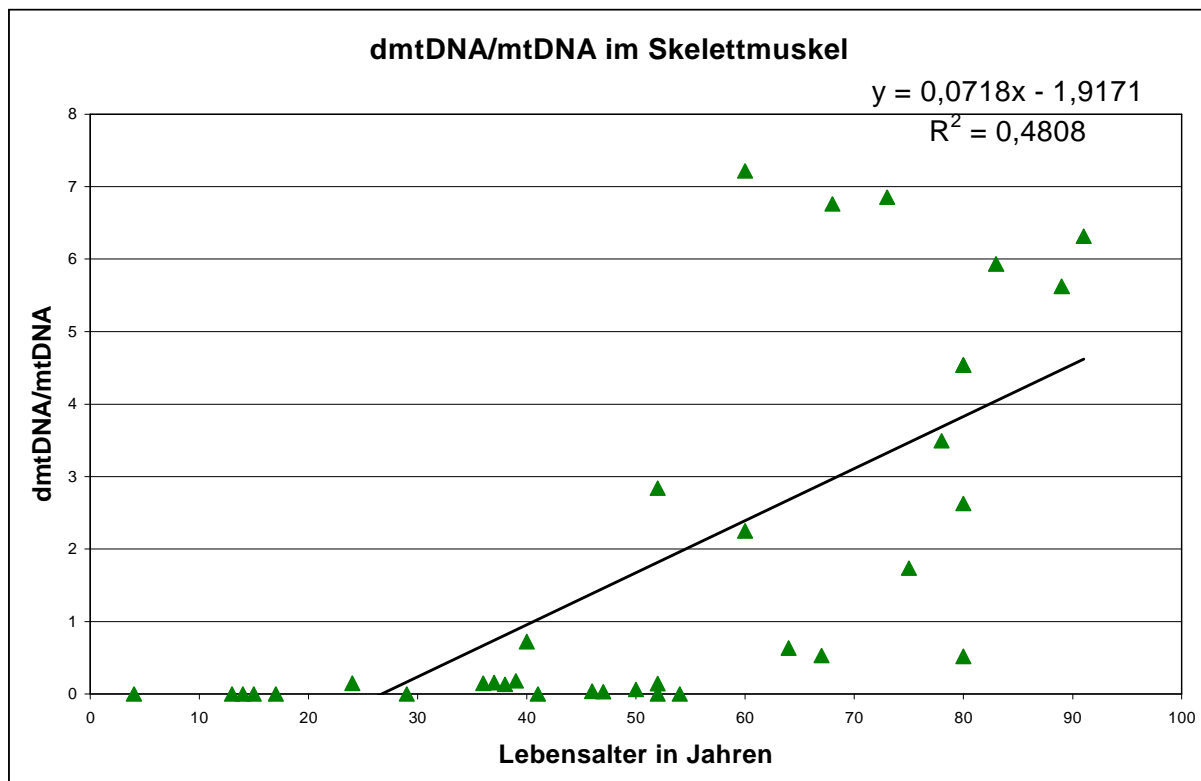
**Abbildung 12: Relative Menge der 4977 bp Deletion im Knochenmark.** Die Gesamt-DNA von 40 Personen im Alter von 4 – 89 Jahren wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.

Ähnlich verhielt es sich bei der mtDNA aus Milzgewebe. Auch hier kam es zum Auftreten der 4977 bp Deletion, jedoch fiel der Korrelationskoeffizient noch geringer aus. Von einer Korrelation vom Auftreten der Deletion mit dem Alter ( $R^2 = 0.0132$ ) kann nicht mehr gesprochen werden (Abb. 13).



**Abbildung 13: Relative Menge der 4977 bp Deletion in der Milz.** Die Gesamt-DNA von 41 Personen im Alter von 4 – 91 Jahren wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.

Zur Kontrolle wurde jeweils auch eine Fragmentanalyse der Patienten aus Skelettmuskel-DNA vorgenommen. Hier ergab sich, wie zu erwarten, eine sehr viel stärkere Korrelation zwischen Alter und dem Auftreten der Deletion. Ab dem 24. Lebensjahr ließ sich die Deletion nachweisen, es ergab sich eine Korrelation von  $R^2 = 0,4808$  zum Lebensalter (Abb. 14).



**Abbildung 14: Relative Menge der 4977bp Deletion im Skelettmuskel.** Die Gesamt-DNA von 35 Personen im Alter von 4 bis 91 Jahren wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Lebensalter aufgetragen.

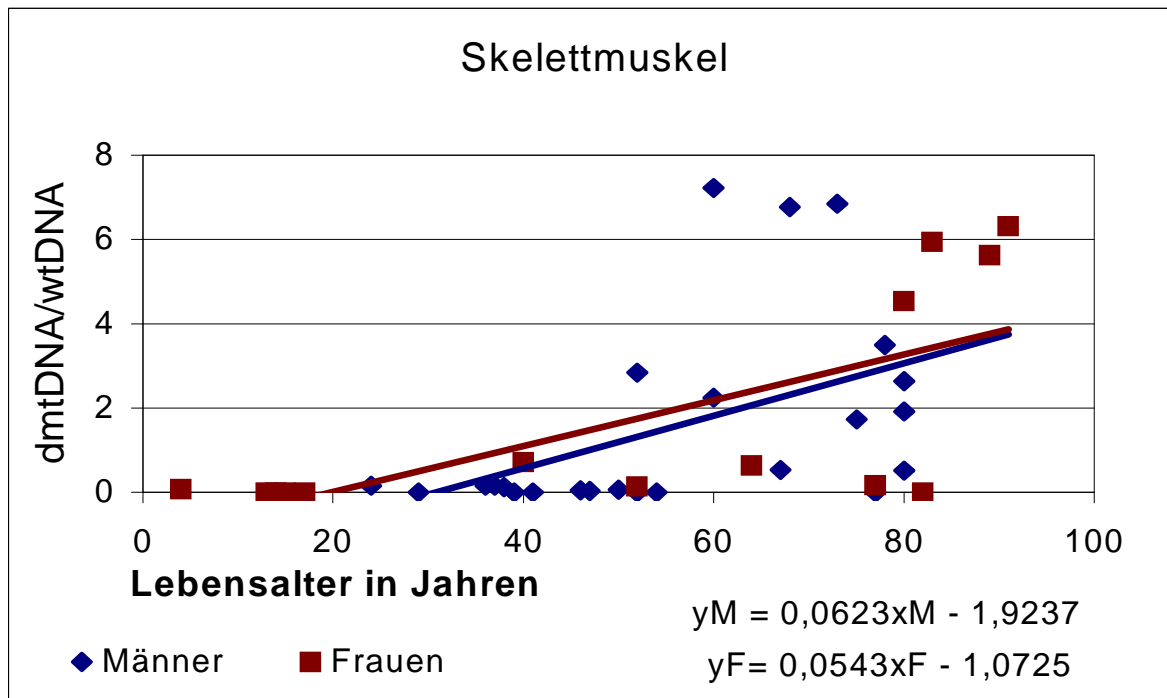
**Tabelle 3: Korrelation zwischen Alter und Quotient aus Auftreten der 4977bp-Deletion zur gesamten mitochondrialen DNA in Blut, Milz, Knochenmark und Skelettmuskel von insgesamt 57 Patienten.** Die Gesamt-DNA wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und dann per Fragmentanalyse die Werte für deletierte und wildtyp mtDNA ermittelt.

Gewebe	Blut	Milz	Knochenmark	Skelettmuskel
$R^2$	0,2265	0,0132	0,0307	0,4808

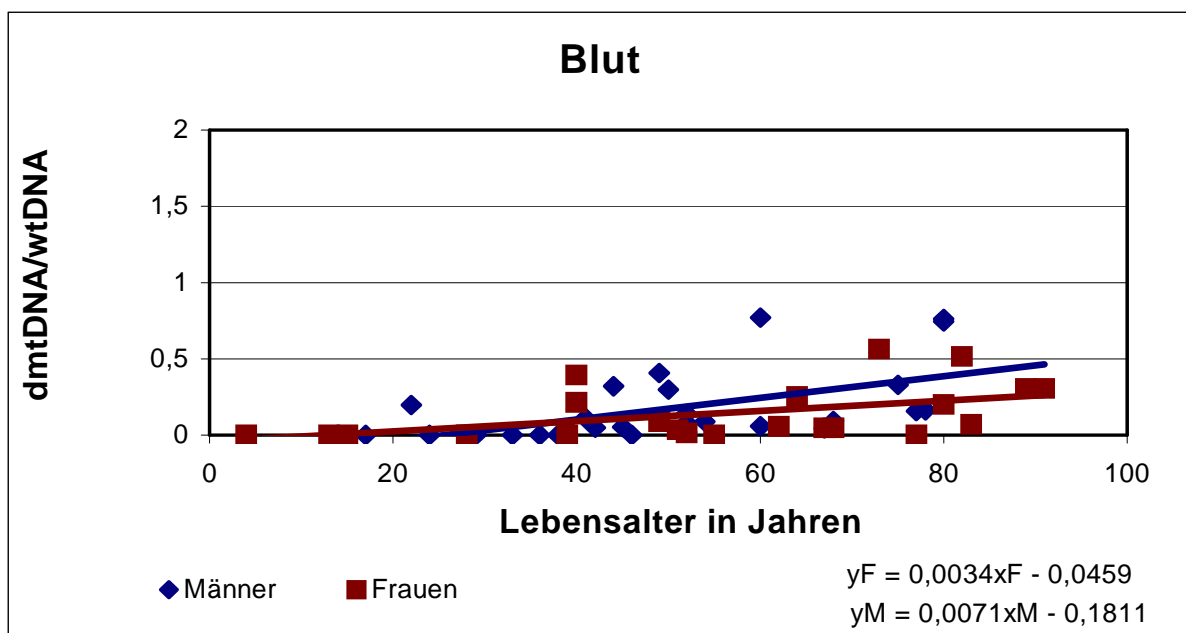
#### 4.1 Geschlechtsabhängigkeit der 4977 bp Deletion

In Hinblick auf das Geschlecht ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Deletion findet sich in allen Geweben etwa gleich verteilt auf beide Geschlechter. Über die jüngeren Patienten kann hier keine Aussage gemacht werden, da die Patienten < 20 Jahren alle weiblich waren. Auch im hohen Alter kommt es zu keinem geschlechtsspezifischen Anstieg.



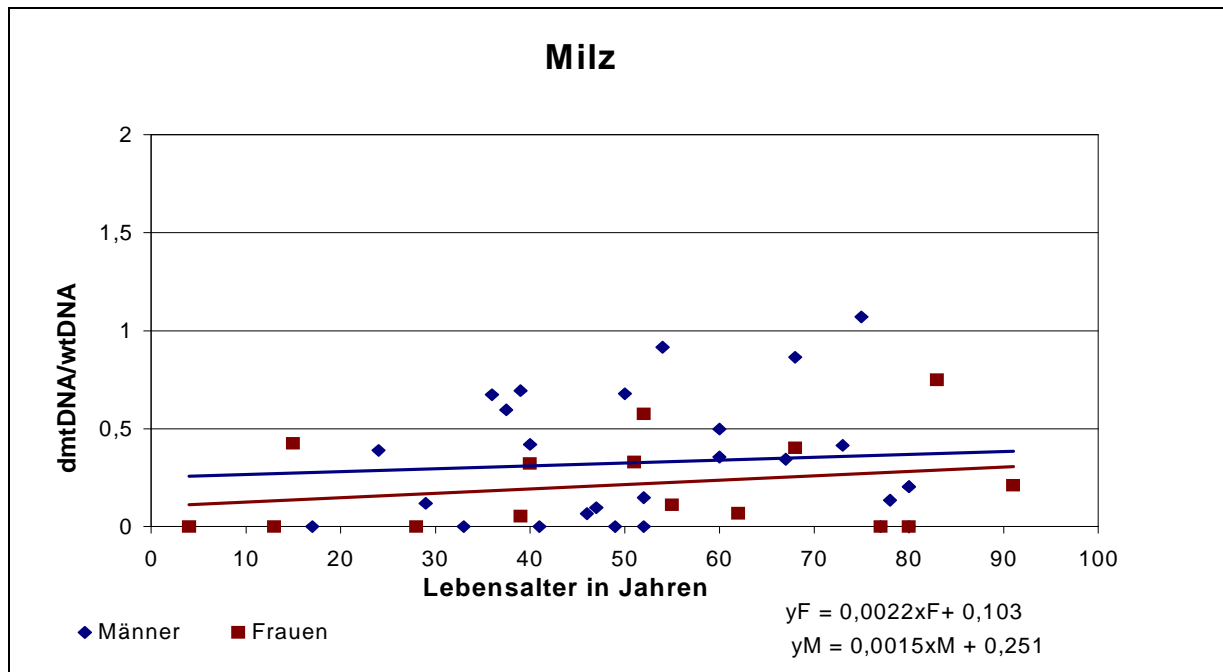


**Abbildung 15: Altersabhängige Zunahme der 4977bp Deletion im Skelettmuskel im Bezug auf das Geschlecht.** Die Gesamt-DNA von 35 bzw. 50 Personen wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Alter aufgetragen.

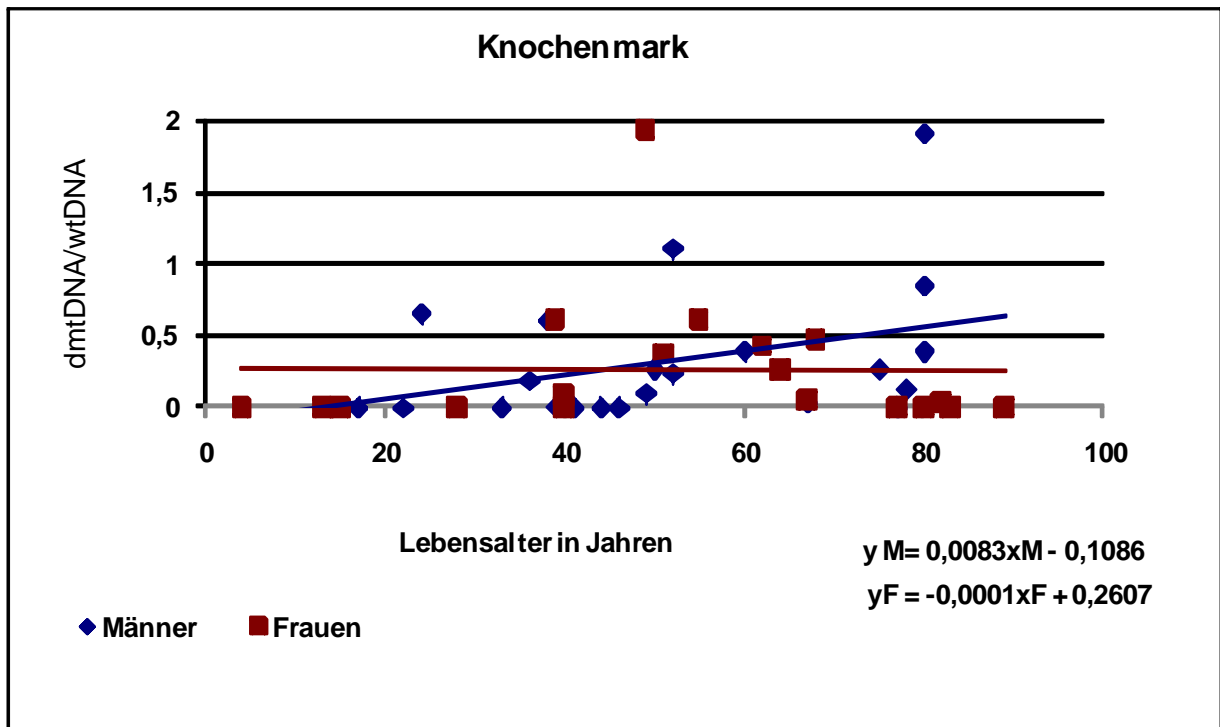


**Abbildung 16: Altersabhängige Zunahme der 4977bp Deletion im Blut im Bezug auf das Geschlecht.** Die Gesamt-DNA von 35 bzw. 50 Personen wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Alter aufgetragen.

Für Milz und Knochenmarksgewebe verhält es sich ähnlich. Auffällig ist jedoch bei den hier erhobenen Daten, dass das Verhältnis von dmtDNA zur mtDNA aus Knochenmark bei Frauen im Laufe der Jahre konstant ist.



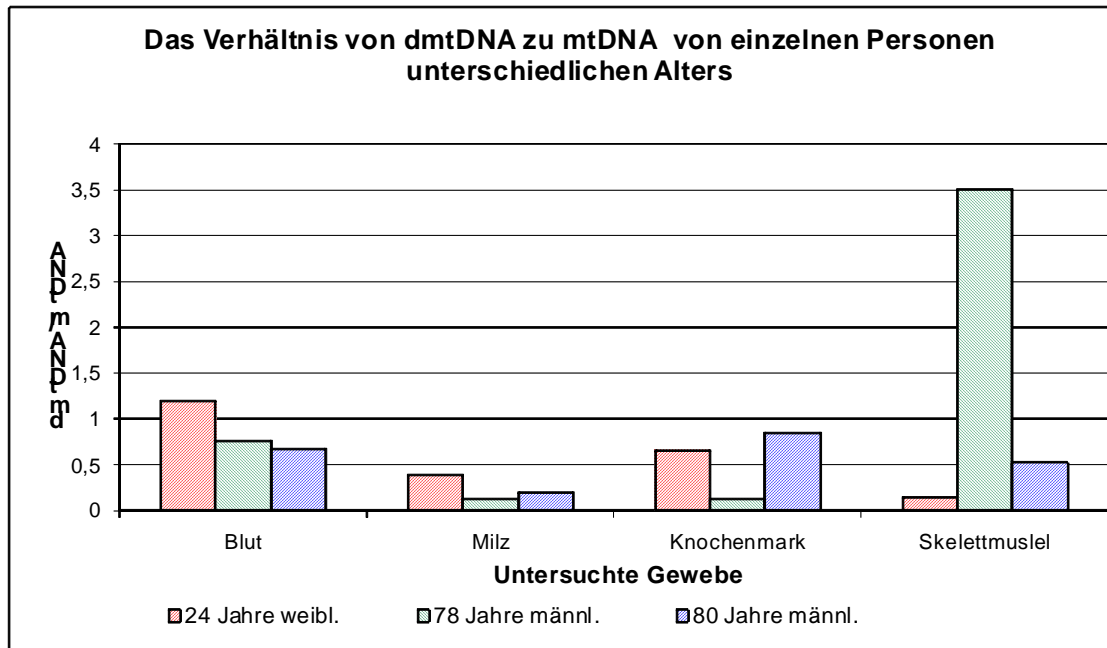
**Abbildung 17: Altersabhängige Zunahme der 4977 bp Deletion der Milz im Bezug auf das Geschlecht.** Die Gesamt-DNA von 35 bzw. 50 Personen wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Alter aufgetragen.



**Abbildung 18: Altersabhängige Zunahme der 4977 bp Deletion des Knochenmarks im Bezug auf das Geschlecht.** Die Gesamt-DNA wurde in eine Duplex-PCR eingesetzt und mittels Fragmentanalyse quantifiziert. Die Beträge für die deletierte DNA wurden zu denen des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt und gegen das Alter aufgetragen.

Exemplarisch werden in Abb. 19. verschiedene Personen unterschiedlichen Alters im Bezug auf das Auftreten der 4977 bp Deletion in verschiedenen Geweben dargestellt. Im Blut der 24 -Jährigen ließ sich dmtDNA nachweisen. Diese findet sich ebenfalls im Skelettmuskel, hier jedoch weniger ausgeprägt. Auffällig ist jedoch der relativ hohe Anteil im Knochenmark und in der Milz.

Des Weiteren zeigt diese Graphik, dass ein relativ häufiges Auftreten der dmtDNA im Skelettmuskel, welches im Alter vermehrt beobachtet wird, keinen Rückschluss auf das Auftreten der 4977 bp Deletion in anderen Geweben zulässt.



**Abbildung 19: Relativer Anteil von dmtDNA in den verschiedenen Geweben der gleichen Personen.** Exemplarisch werden verschiedene Personen unterschiedlichen Alters im Bezug auf das Auftreten der 4977 bp Deletion in verschiedenen Geweben dargestellt.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Auswahl des Probenmaterials**

Für dieses Projekt wurden Proben von zu obduzierenden Leichen aus dem Jahre 2003 im Institut für Rechtsmedizin zu Kiel und zu Lübeck entnommen. Die jüngste Person war 4 Jahre alt, die älteste 91. Ausgeschlossen wurden Proben von solchen Leichen, deren postmortales Intervall größer als 48 Stunden war und solche bei denen Fäulnisprozesse eingesetzt haben, da die DNA starken Umbau- und Zersetzungsprozessen unterlegen ist und es zusätzlich zur Entstehung von PCR-inhibierenden Substanzen kommen könnte.

Ferner wurden solche Personen ausgeschlossen, bei denen eine auf mitochondrialer Ebene liegende Grunderkrankung bekannt oder vermutet wurde. Prinzipiell lassen sich zwei klinische Erscheinungsformen unterscheiden: selektive Myopathien und multisystemische Erkrankungen. Weitere Grunderkrankungen, die nachweislich oder mit hoher Wahrscheinlichkeit das mitochondriale Genom schädigen können sind Diabetes mellitus (Suzuki et al., 1999.), KHK (Corral-Debrinski et al., 1991 u. 1992), Nephropathien (Lim et al., 2000), Hepathopathien und Endokrinopathien. Patienten mit diesen Grunderkrankungen wurden nicht zwangsläufig ausgeschlossen. Diese Volkskrankheiten treten so häufig auf, dass ein Ausschluss dieses Patientengutes die Gültigkeit des Rückschlusses auf die Gesamtbevölkerung des zu untersuchenden Merkmals nicht erlauben würde. Die vorgenommene Selektion erlaubt nicht die Unterscheidung von kurzfristigen Einflüssen oder dauerhaften pathologischen Vorgängen. Zu diesem Zweck hätten Proben der Individuen zu mehreren Zeitpunkten vorgenommen werden müssen. Dann wäre auch einer Einschätzung von intra- und interindividuellen Unterschieden möglich. Da in dieser Studie humanes Obduktionsmaterial untersucht wurde, war ein solcher Ansatz nicht möglich.

## **5.2 Auswahl der verschiedenen Gewebe**

Es wurden insgesamt vier verschiedene Gewebe untersucht. Bisher wurde eine Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion der mtDNA in ausdifferenziertem Geweben postuliert (Berdanier et al., 2001; Meissner et al., 2001). Andere besagen, dass es zu einer Abhängigkeit in Bezug auf das biologische Alter käme, eine direkte Korrelation mit dem Alter bestünde nicht. Größeren Einfluss scheinen wohl Kofaktoren wie Zigarettenkonsum (Fahn et al., 1997), Alkoholkonsum (Mansouri et al., 1997; Formenty, Pessayre, 1997; Demeilliers et al., 2002), andere Substanzen (Chahill et al. 1997, Lee et al, 2000), Medikamente (De Mendoza et al., 2004, Tovo et al., 2001) und die bereits genannten Krankheiten zu spielen.

In dieser Arbeit wurde nach dem Ort der Entstehung der 4977 bp Deletion gesucht. Es ließ sich schon im Knochenmark die 4977 bp Deletion finden. Doch hier wurde eine viel größere Variabilität und insgesamt ein geringeres Auftreten beobachtet. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich die Deletion bereits, wenn auch in sehr viel geringerer Ausprägung, schon in den Vorläuferzellen befindet, da zuvor makroskopisch eine Selektion des roten Knochenmarks erfolgte. Das Fettmark wurde nicht verwendet. Bei den gleichen Patienten wurde ferner die 4977 bp Deletion in der mtDNA der Milz untersucht, die Hauptabbauort der Erythrozyten und Granulozyten ist und einen Teil der Thrombozyten speichert. Da reife Erythrozyten selbst keine Mitochondrien mehr aufweisen, kann vermutet werden, dass es sich bei der gefundenen mtDNA um Granulozyten-, Lymphozyten- oder Plasmazell-mtDNA oder um mtDNA des Milzgewebes selbst handelt. Thrombozyten besitzen zwar keine Kern- jedoch mitochondriale DNA. Damit kann eine variable Thrombozytenzahl im Blut Einfluss auf die analysierten Werte für die mtDNA erhalten. Hierdurch lässt sich zusammenfassend hinreichend erklären, dass es zwar zu einem starken Auftreten der 4977 bp Deletion mit dem Alter kam, aber diese verglichen mit dem des Blutes wesentlich weniger ausgeprägt war. Um dies zu erklären müsste zum Vergleich die

Deletion in gewaschener also blutleerem Milzgewebe und wie hier gewonnenem Gewebe erfolgen.

Zur Kontrolle wurde die 4977 bp Deletion zusätzlich im Skelettmuskel detektiert. Hier ist in mehreren Studien eine Altersabhängigkeit festgestellt worden (Meissner et al., 1997; Arnheim, Cortopassi, 1992; Lee et al., 1994; Yen et al., 1994). Es wurden Proben aus dem leicht zugänglichen M. quadrizeps femoris entnommen. Es hatte sich in anderen Arbeiten gezeigt, dass sowohl Trainingszustand wie auch unterschiedliche Muskelgruppen keine wesentliche Auswirkung auf das Auftreten der 4977 bp Deletion haben. Jedoch ist in gut trainierten Muskelpathien prozentual weniger Deletionen zu finden. Dies könnte durch bessere Reparatur- und Schutzmechanismen zustande kommen oder aber dadurch dass Zellen mit intaktem Genom häufiger die mitotische Teilung vollziehen, obwohl die Replikation der deletierten DNA aufgrund Größendifferenz schneller erfolgen sollte. Die in dieser Studie nachgewiesene Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion im Skelettmuskelgewebe zeigt, dass die angewandte Methode richtig und damit auch für die anderen Gewebe sehr wahrscheinlich sichere Resultate erbringt.

### **5.3 Auswahl der DNA- Extraktionsmethode**

Es wurden in dieser Arbeit mehrere DNA-Extraktionsverfahren verwendet, die sich insbesondere durch den zeitlichen Aufwand und die Kosten unterscheiden.

#### **5.3.1 Qualität und Quantität**

Am zeitlich aufwendigsten, jedoch auch am kostengünstigsten, wenn die Arbeitszeit außer Acht gelassen wird, ist die Aussalzmethode nach Wash et al.. Dieses Verfahren wurde allerdings nur für das Blut verwendet. Man erhielt hier ein ausreichend großes, makroskopisch reines Pellet. Von der Handhabung und vom zeitlichen Aufwand gesehen, war die Verwendung

des Nucleo Blood Quick Pure nach Machery –Nagel sicherlich die angenehmste Methode.

Für Milz-, Knochenmark- und Skelettmuskel mussten andere Verfahren verwendet werden. Hier war von der Handhabung und vom zeitlichen Aspekt aus gesehen, die Extraktion aus Gewebe mittels Genomic DNA Purification Kit von Puregene® der mittels Super Quick Gene Kit von Immucor zu bevorzugen. Auch die DNA- Pellets, aus Knochenmark und Milz, die wenn sie mittels Super Quick Gene Kit von Immucor extrahiert wurden, häufig gelblich, bzw. rötlich verunreinigt waren, sahen hier makroskopisch sauberer aus. Das erhaltene Pellet war in etwa gleich groß. Das größte Pellet ergab sich eindeutig bei der Aussalzmethode nach Wash et al. Hier konnten jedoch auch größere Mengen an Blut eingesetzt werden. Das größere Pellet ist daher eher auf die größere Menge an eingesetztem Gewebe (Blut) zurückzuführen. Wichtig ist, dass mit allen Kits eine ausreichende Menge an DNA extrahiert werden konnte.

### **5.3.2 Einfluss auf die Untersuchungsmethode**

Die Auswahl des Extraktionsverfahrens hatte keinen Einfluss auf die weiteren Untersuchungsmethoden, sieht man davon ab, dass die mittels Super Quick Gene Kit von Immucor gewonnene DNA zum Teil auf Grund von Verunreinigungen noch weitere Waschungen mit Ethanol unterzogen wurden. Aber auch diese Verunreinigungen ohne vorangegangene Waschungen beeinflussten die sich anschließenden PCRs nicht negativ.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der Einfluss auf die Untersuchung hat, ist die Frage der postmortalen Beständigkeit der DNA und insbesondere von mtDNA. Kommt es beim Zugrundegehen des Individuums und bei der Lyse der Zellorganellen zur Destruktion von DNA und mehr noch der mtDNA durch die Freisetzung von Radikalen? Es hat sich gezeigt, dass undeletierte mtDNA sich länger als nukleäre DNA postmortal nachweisen lässt (Fisher et al., 1992). Dies wird dadurch erklärt, dass eine Vielzahl von mtDNA- Kopien in einer Zelle vorkommen und nicht alle gleichzeitig zu Grunde gehen und weiterhin nicht die gesamte DNA nachgewiesen



wird, sondern nur Fragmente. Um den Einfluss der postmortalen Degradation dennoch soweit wie möglich einzuschränken, wurde das postmortale Intervall kleiner als 48 Stunden gewählt.

#### **5.4. Relative Quantifizierung von PCR-Produkten mittels Duplex –PCR und automatische Fragmentanalyse**

Eine Bestimmung von dmtDNA, wtmtDNA und nDNA ist nur möglich, wenn zuvor eine Vervielfältigung von bestimmten spezifischen Sequenzen erfolgte. Dieses kann mittels PCR erfolgen, indem idealerweise bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung der gesuchten Frequenz kommt.

Um einen Vergleich zwischen dmtDNA und wtmtDNA sowie wtmtDNA und nDNA vorzunehmen, kam eine Duplex- PCR zur Anwendung. Dies hat den Vorteil, dass im Gegensatz zur Singleplex- PCR der Ansatz und die hier eingesetzten DNA- Menge in einem gewissen Rahmen nicht ins Gewicht fallen. Gefordert werden hierzu muss, dass die beiden zu reproduzierenden DNA-Fragmente annähernd die gleiche Größe haben, da gilt, um so kleiner die Fragmente sind, desto schneller und effizienter werden diese amplifiziert (Newton et Graham, 1994). Dies ist durch die eingesetzten Primer L15/H16 (260 bp) und L35/H45 (235 bp) annähernd der Fall.

Die Nachweisgrenze für die eingesetzten PCRs liegt im Bereich von 10 fg für eingesetzte undeletierte nDNA und 100 pg für deletierte mtDNA (Meissner et v. Wurmb, 1998), wodurch gewährleistet wird, dass auch geringe Mengen nachgewiesen werden können.

Mit der Duplex- PCR ist es nicht nur möglich Vergleiche zwischen zwei Fragmenten zu ziehen, sondern auch gleichzeitig falsch negative Ergebnisse aufzudecken. In diesem Fall wäre weder dmtDNA noch wtmtDNA nachweisbar. Dies kann zwei Ursachen haben, entweder befindet sich keine DNA im Ansatz oder eine Inhibierung der PCR hat vorgelegen. Ist jedoch nur wtmtDNA nachweisbar, ist entweder zu viel Template in die PCR eingesetzt worden oder es liegt tatsächlich keine deletierte mtDNA (bzw. unter der Nachweisgrenze) vor.

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese kann eine Analyse der Fragmente erfolgen. Hier wurde sie jedoch nur verwendet, um zu prüfen, ob es überhaupt zur Amplifikation kam.

Die eigentliche Quantifizierung erfolgte durch die automatische Fragmentanalyse. Sie ist auch kein absolutes Verfahren, sondern erlaubt lediglich eine relative Quantifizierung. Im ABI Prism<sup>®</sup> Genetic Analyser werden fluorezenzmarkierte PCR-Produkte mittels Kappillarelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion erfolgt indem ein kleiner Teil der eingesetzten Probe durch die mit Polymer gefüllte Kapillare geleitet wird und mittels Laser detektiert wird. Für eine Probe benötigt das Gerät 30 Minuten. Wenn eine größere Anzahl an Proben detektiert werden soll, scheint dies zunächst zeitaufwändig, jedoch erfolgt die Analyse automatisch und das Gerät kann mit 48 Proben beladen werden. Diese werden hintereinander automatisch analysiert.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob es mit zunehmendem Alter zu einer Zunahme der 4977 bp Deletion kam. Hierzu wurde das Verhältnis von Unterkurvenflächen (ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyser) von deletierter mtDNA und nicht deletierter mtDNA betrachtet. Eine absolute Quantifizierung fand nicht statt. Die wäre jedoch, wenn diese Methode zur Altersbestimmung herangezogen werden sollte, sinnvoll. Da nur absolute Werte, also die tatsächliche Anzahl an dmtDNA- und wtDNA-Molekülen, eine exakte Einordnung erlauben würden. Hier müsste dann z.B. eine Real-time-PCR herangezogen werden. Nach vorangegangenen Eichprozessen wäre hier mit eine absolute Quantifizierung möglich.

Für die vorliegende Zielsetzung erscheint die angewandte Methode als völlig ausreichend, da eine Beantwortung der in dieser Arbeit gestellten Fragen mit der hier zur Anwendung gekommenen Methode (ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyser) hinreichend möglich ist.

### **5.5 Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion**

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es zu einer altersabhängigen Zunahme der 4977 bp Deletion in den verschiedenen Geweben kommt. Wenn dies der Fall wäre, würde die 4977 bp Deletion ein wichtiger Faktor in der forensischen Medizin zukommen. Die mit dem Lebensalter zunehmende mitochondriale Schädigung wird von einigen Autoren selbst als Mechanismus der Alterung diskutiert (Linnane et al., 1989; Metow et al.; 1999; Wallace, 1999; Zung et al., 1999; Barja, 2000; Berdanier et Everts, 2001). Würde man z.B. Blutspuren finden, so wäre dann auch neben der Geschlechts- und individuellen DNA- Musterbestimmung (genetischer Fingerabdruck) die Altersbestimmung des Individuums möglich. Eine differenzierte Beurteilung dieser Frage erfolgte durch Masuyama et al. (2001). Aus acht verschiedenen Geweben von Mäusen aus fünf verschiedenen Altersklassen wurde der mtDNA-Gehalt getestet. Insgesamt wurde der höchste DNA-Gehalt in Skelett- und Herzmuskel ermittelt, der geringste im Knochenmark. Ein altersabhängiger Anstieg wurde dabei in Skelettmuskel, Herzmuskel, Niere, Milz und Lunge nachgewiesen. Nicht jedoch im Knochenmark. Diese Studie macht jedoch nur eine Aussage über mtDNA und nicht über die dmtDNA und den relativen Anteil der dmtDNA zur mtDNA. Es stellt sich vielmehr auf Grund dieser Studie die Frage, ob die Zunahme der mtDNA im Laufe des Lebens auf einer Zunahme an deletierter DNA begründet ist.

Ähnliche Resultate ergaben sich aus dieser Arbeit. Es fand sich eine Zunahme von deletierter mtDNA im Skelettmuskel, wobei jedoch große interindividuelle Schwankungen vorlagen. Eine geringe Zunahme lag auch im Blut vor. Keine alterskorrelierte Zunahme der 4977 bp Deletion fand sich, wie auch andere Arbeiten postulierten, im Knochenmark. Im Gegensatz zu der oben genannten Studie fand sich keine Korrelation zwischen dem Lebensalter und dem Auftreten der 4977 bp Deletion im Milzgeweben.

### **5.5.1.1 Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion im differenzierten Gewebe**

Es gibt viele verschiedene Theorien über Alterungsprozesse eines Organismus, von denen meistens die Kombination für die Alterung verantwortlich gemacht wird.

Durch mehrere Arbeitsgruppen wurde die 4977 bp Deletion in postmitotischem Gewebe nachgewiesen. Sie konnte unter anderem in Herzmuskel (Cortopoossi et al., 1992), Skelettmuskel (Hsieh et al., 1994; Meissner et al., 1997 u. 1999), in Haut (Birch- Machin et al., 1998), im Larynx (Manaligod et al., 2000) und in Blut (von Wurmb et al., 1998) nachgewiesen werden.

Eine mit dem Alter zunehmende Anzahl an deletierter mtDNA konnte, wie schon in anderen Arbeiten zuvor, im Skelettmuskel gefunden werden. Jedoch ist es mit dieser Methode nicht möglich eine exakte Altersbestimmung vorzunehmen. Es kann lediglich eine grobe Einordnung erfolgen (max. in 10- 20 Jahresschritte), da viele exogene und endogene Faktoren, wie sie noch unter Punkt 5.6 beschrieben werden, einen Einfluss auf die mitochondriale DNA und somit auf das Auftreten der 4977 bp Deletion haben.

Dieser Einfluss scheint fast größer das Auftreten der 4977 bp Deletion zu beeinflussen, als das zunehmende Lebensalter selbst. Diese Noxen bzw. Erkrankungen wirken natürlich über die Zeit gesehen mehr und mehr auf die mtDNA ein und produzieren so auch mehr und mehr Deletionen, die als Fehlfunktionen der Reparaturmechanismen aufgefasst werden können.

#### **5.5.1.1 Skelettmuskel**

Der Skelettmuskel gehört neben dem Herzmuskel zur quergestreiften Muskulatur. Die Muskelfasern bilden ein Synzytium, das in der Embrionalperiode durch Verschmelzung von zahlreichen Myoblasten entsteht. Eine Faser besitzt auf einer Länge von 1 mm etwa 50-100 Zellkerne. Die Zahl der Zellkerne pro Faser (1-10 cm Länge) beträgt also 500-10.000.

Ein  $\text{mm}^3$  Muskelgewebe enthält in etwa 50.000 Muskelzellkerne. Der Skelettmuskel setzt sich aus mehreren Typen von Muskelfasern zusammen (Zuckungsfasern: Typ 1, Typ 2A, Typ 2B und Tonusfasern). Diese unterscheiden sich durch die Kontraktionskraft. Sie ist insbesondere abhängig von der Anzahl der Mitochondrien. (TYP 2A > Typ 1 > Typ 2B) und damit dem schnell zur Verfügung stehendem ATP (Benninghoff, 1994). In dieser Arbeit wurde jedoch keine Selektion der Muskelfasern vorgenommen. Der M. quadriceps enthält eine Mischung aus diesen Fasern.

Bei körperlichem Training ist eine Änderung der Faserzusammensetzung möglich. Im Laufe des Lebens nimmt die Zahl der Muskelfasern kontinuierlich ab (beginnend mit dem 20. Lebensjahr). Mit 50 Jahren sind bereits 10 % der Fasern verschwunden. Im hohen Alter (>70 J.) ist in der Regel eine deutliche Muskelatrophie festzustellen (Reduktion der Faserzahl und -querschnitte bis zu 50 %). Das qualitative Verhältnis Typ 1- zu Typ 2-Fasern bleibt dabei in etwa konstant.

In dieser Arbeit zeigt sich, wie schon in Vorarbeiten, dass es mit zunehmendem Alter zu einem relativen Mehrauftreten der 4977 bp Deletion kam. Eine Altersabhängigkeit des Auftretens der 4977 bp Deletion wurde bereits zuvor für Skelettmuskel (Barrientos et al., 1997), Lungengewebe (Lee et al., 1998) und Gehirn (Barrientos et al., 1997) postuliert. Dagegen fanden andere Arbeitsgruppen keine altersabhängigen Anstieg mitochondrialer DNA (Frahmet et al., 2005; Miller et al., 2003). Hierbei handelt es sich jedoch um die Relation zwischen mtDNA zur nDNA und nicht den der dmtDNA. Die Muskelmasse selbst nimmt jedoch mit zunehmendem Alter ab. Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass der relative Anteil an mitochondrialer DNA zur Kern-DNA über die Lebenszeit konstant ist, obwohl sich die Faserzusammensetzung und damit sich das Verhältnis von mtDNA zur nDNA ändert. Somit scheint die 4977 bp Deletion im Skelettmuskel gegenüber nicht deletierter mtDNA einen gewissen Selektionsvorteil zu haben, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die dmtDNA kürzer ist und somit schneller zu replizieren ist.

Weiterhin wird im Muskelgewebe ein großer Anteil an ATP benötigt, welches in den hier zahlreich vorhandenen Mitochondrien gebildet wird. Im Laufe des Lebens werden hier zwangsläufig, im Gegensatz zu Geweben mit niedrigem Energieumsatz, vermehrt als „Nebenprodukt“ freie Radikale gebildet, die dann eine Schädigung der mtDNA bewirken können. Weiterhin zeigen einige Arbeiten, dass die 4977 bp Deletion stärker in Geweben mit größerem metabolischen Umsatz und auch geringerem Zellturnover akkumulieren (z.B. Gehirn, Herzmuskel, Skelettmuskel) (Botto et al., 2005). Dies bedeutet, dass der Zeitpunkt, an dem die Zelle mit der Apoptose beginnt im Vergleich zu Zellen mit einem hohen Zellturnover sehr viel später ist und somit die auf die DNA einwirkenden Faktoren über eine längere Zeit einwirken können und mehr Schäden (Deletion) verursachen können.

#### **5.5.1.2 Blut**

Auch im Blut kommt es mit zunehmendem Lebensalter zu einer Zunahme der 4977 bp Deletion. Jedoch ist die Korrelation im Vergleich zum Skelettmuskel wesentlich geringer (vgl. Kapitel 4.2.1.1.). Es ergab sich in dieser Untersuchung eine Korrelation von  $R^2 = 0,2265$ .

Weiterhin zu beachten ist die kontroverse Diskussion bezüglich der altersabhängigen Zunahme der mtDNA selbst im Blut. Während einige Autoren eine positive Korrelation zum Lebensalter diskutieren (Linnet et al., 2005), gehen andere Arbeitsgruppen sogar von einer Absenkung der mtDNA in Blutproben von Patienten mit Verdacht auf mitochondriale Erkrankungen aus, während bei den gleichen Personen eine Zunahme der mtDNA-Menge in Skelettmuskel nachgewiesen wurde (Bai et al., 2004). Die hier erhobenen Daten ergaben eine Korrelation der mtDNA zur nDNA im Blut von  $R^2 = 0,0245$ . Somit kann man auf Grund der Daten nicht von einer Zunahme der mitochondrialen DNA im Laufe des Lebens sprechen.

Wichtig für die Beurteilung ist, dass hier vorher keine Selektion der einzelnen Blutzellen stattgefunden hat und die zirkulierenden Zellen alle unterschiedliche Lebenserwartungen haben. Erythrozyten tragen keine

DNA und sind daher in dieser Arbeit zu vernachlässigen. Lediglich der Reticulozyt, der sich aus der kernhaltigen Vorstufen des Erythrozyten, den Normoblasten, entwickelt, enthält noch Nukleinsäuren. Hier handelt es sich jedoch um RNA. Vor Allem in der Milz entstehen dann die von Kern- und Zytoplasmastrukturen völlig normalen Erythrozyten. Thrombozyten enthalten nur noch mtDNA, Kern-DNA besitzen sie nicht. Daher können sehr variable Thrombozytenzahlen Fehlschlüsse auf den relativen Teil der mtDNA zur nDNA verursachen. Bands et al. wiesen in ihrer Studie nach, dass thrombotische Blutproben einen geringeren Anteil mtDNA zur nDNA im Vergleich zu thrombozytenreichen hat (Banas et al., 2004). Eine Selektion der Thrombozyten wäre mit einem sehr hohen Aufwand verbunden, daher wird wie auch in anderen Arbeiten (von Wurmb et al., 1998, Bhat u. Epelboym, 2004) darauf verzichtet.

Die postnatale Blutbildung findet beim Gesunden im Knochenmark und in den lymphatischen Organen statt. Erythropoese, die Granulopoese (neutrophile, eosinophile und basophile), die Megakaryozytopoese zum kleinen Teil auch die Lymphopoese sind im Knochenmark lokalisiert. Der überwiegende Teil der Lymphopoese erfolgt in den Lymphatischen Organen.

Die Leukozytenzahl, die den größten Teil der DNA- haltigen Blutzellen ausmacht, wird beeinflusst durch Infektionen, Entzündungen, Tumorerkrankungen, hier insbesondere Leukämien, Knochenmarksdepressionen, Infarkten, Verbrennungen und Vergiftungen. Die Anzahl der Leukozyten ist bei Neugeborenen besonders hoch und sinkt mit zunehmendem Lebensalter (Neugeborene: 9.000-30.000/ $\mu$ l; Erwachsene: 4.300-10.000/ $\mu$ l).

Gehäuft ist eine chronische Leukozytose in Zusammenhang mit Nikotinabusus beschrieben (Schwarz u. Weiss, 1994; Parry et al., 1997). Dies könnte die große Schwankung der extrahierten Gesamt- DNA- Menge bei immer gleich groß eingesetzten Blutmengen erklären.

Auch bakterielle Infektionen erhöhen die relative Leukozytenzahl, virale senken sie. Weiterhin beschreibt die Streßleukozytose eine Erhöhung der

Leukozyten bis auf das Doppelte, indem die sonst an der Gefäßwand haftenden Leukozyten mobilisiert werden. Auch dies hat Einfluss auf die postmortale Bestimmung. Die zum Tode führende Ursache (Erkrankung, Unfall, etc.) bewirkt also eine relative Veränderung der Leukozytenzahl im zirkulierenden Blut und somit der in dieser Arbeit gesuchten DNA.

Eine Leukopenie kann durch den vermehrten Abbau in der Milz (Splénomegalie), durch Leberzirrhose (Speicherung) und immunologische Vorgänge (z.B. Lupus erythematodes) hervorgerufen werden.

Nicht zu vernachlässigen sind hier auch Medikamente (Analgetika, Antirheumatika sowie andere chemische Stoffe z.B. Benzol), welche eine Agranulozytose bewirken können. Hierdurch kann es zu einem relativen Anstieg der dmtDNA zur mtDNA kommen. Da es zu keiner Zellneubildung (DNA-Replikation nach entsprechender Reparatur) kommt.

Eine weitere Wirkstoffklasse, die insbesondere Auswirkung auf die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle hat, ist die der Anti-HIV-Medikamente (HAART). Diese Medikamente beeinflussen die Zellreplikation insbesondere der Zellen des Immunsystems. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der mtDNA pro Zelle.

Einen Teil der Leukozyten machen die Lymphozyten aus. Hier ist insbesondere die unterschiedliche Lebensdauer von 7 bis 500 und mehr Tagen zu erwähnen. Jedoch befinden sich von ihnen nur ca. 4% im peripheren Blut (davon 70 –80% T-Lymphozyten), etwa 70% in Organen des Lymphatischen Systems und 10% im Knochenmark. Im peripheren Blut entstammt also der Großteil der hier betrachteten Kern- und auch mtDNA den Granulozyten insbesondere den Neutrophilen Granulozyten. Ihre Lebensdauer beträgt 2 –3 Tage, die Halbwertszeit der im Blut zirkulierenden Granulozyten 6.-7 Stunden. Die Aufgabe dieser ist insbesondere die Abtötung bzw. Inaktivierung vor allem mit Hilfe des oxidativen Mechanismus von virusinfizierten Zellen, Mikroorganismen und Tumorzellen. Somit kommt es z.B. bei einer Infektion nicht nur zu einer Zunahme der Zellzahl, sondern auch zu einer Zunahme der freien Radikale



(deren Rolle wird noch in Punkt 5.6.2 diskutiert) zur vermehrten Schädigung der mtDNA.

Das vermehrte Auftreten der dmtDNA scheint jedoch auch eine gewisse altersabhängige Komponente zu haben, die sich am ehesten sekundär ergibt. Auch ohne den Einfluss von Störfaktoren (Infektionen und Tumorleiden) kommt es im Laufe eines humanen Lebens zum vermehrten Auftreten von dmtDNA. Die Schädigung der mtDNA ist im Vergleich zur nDNA dauerhafter, da im Mitochondrium im Gegensatz zum Zellkern nur sehr viel weniger Kontroll- und Reparaturmechanismen vorhanden sind und ein irreparabler Schaden hier nicht zwangsläufig zur Apoptose der Zelle oder zum Untergang des Mitochondriums führt. Weiterhin ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob in einer Zelle entweder dmtDNA neben nicht deletierter mtDNA gleichzeitig vorhanden ist oder ob eine Zelle entweder nur dmtDNA oder nicht deletierte mtDNA enthält. Vermutet wird heute Ersteres. Einfacher und schneller zu replizieren, da sehr viel kürzer, scheint wohl die dmtDNA zu sein. Auch dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die dmtDNA im Laufe der Zeit relativ gesehen zunimmt. Wenn man dies jedoch betrachtet im Bezug auf die relativ kurze intrakapilläre Verweildauer der Zellen, kann dieser Einfluss kaum während der Zeit zur Geltung kommen in der die Zellen im Blut zirkulieren. Sollte ein größerer Zusammenhang mit dem Replikationszyklus vorhanden sein, müsste dieser schon in den Vorläuferzellen bzw. Stammzellen zur Geltung kommen. Um dies zu klären wurden in dieser Arbeit daher auch Knochenmark- und Milzproben in Bezug auf ihr altersabhängiges Vorkommen der 4977 bp Deletion untersucht.

#### **5.5.1.1 Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion im hämatopoetischen Gewebe**

Die Hämatopoese spielt sich beim Menschen im Knochenmark und den lymphatischen Organen ab. In dieser Arbeit soll neben der Frage der Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion auch der Ort der Entstehung

dieser gesucht werden. Hierzu wurden Proben aus Milz und Knochenmark untersucht.

#### **5.5.2.1 Knochenmark**

Um den Ort der Entstehung der 4977 bp Deletion und eine mögliche Altersabhängigkeit zu prüfen, wurde DNA aus dem roten Knochenmark (Sternum) extrahiert. Die Selektion des roten Knochenmarks vom Fettmark erfolgte makroskopisch.

Die Myelozyten setzen sich aus Stammzellen und Vorläuferzellen der Erythro-, Granulo- und Thrombozyten sowie Monozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Gefäßendothelien zusammen. Wie bereits oben erwähnt besitzen die unreifen Erythroblasten und Megakaryozyten, als Vorläufer der Thrombozyten, noch Zellkern und Mitochondrien, so dass diese dann auch ihren Teil zur extrahierten DNA hier im Gegensatz zum peripheren Blut beitragen.

Es kam zwar in den untersuchten Proben zu einer geringen Zunahme der dmtDNA mit zunehmendem Lebensalter, jedoch ist die Korrelation im Vergleich zu der des Skelettmuskels deutlich geringer. Von einer direkten altersabhängigen Zunahme der dmtDNA im Knochenmark kann daher nicht gesprochen werden.

Myelozyten haben einen relativ niedrigen Energieumsatz, während sie einen hohen Zell-turnover besitzen.

Trotz dieser sehr hohen Replikationszahl kommt es hier im Laufe des Lebens zu keiner nennenswerten Zunahme der 4977 bp Deletion. Dies kann folgende Gründe haben: Entweder liegen hier ausreichend gute Reparaturmechanismen vor, wie sie jedoch auch in jedem anderem Mitochondrium, jeden anderen Gewebes vorliegen oder die entsprechende Zelle geht frühzeitig in die Apoptose über oder die deletierte DNA wird nicht, wie in anderen Arbeiten postuliert, bevorzugt auf Grund ihrer Kürze repliziert. Daher scheint der niedrige Energieumsatz am ehesten Einfluss auf das Auftreten der dmtDNA zu haben und die damit im geringeren

Ausmaß auftretenden freien Radikale, deren Rolle noch in Punkt 5.6.2 weiter diskutiert wird.

Weiter wurde nach dem Ort des Entstehens der 4977 bp Deletion gesucht. In den untersuchten Geweben einer 24-Jährigen fand sich im Vergleich zu etwa Altersgleichen die 4977 bp Deletion vermehrt im Blut. Auffallend ist ferner, dass sich die Deletion auch in den anderen untersuchten Geweben vermehrt finden lässt (vgl. Abb. 19). Das lässt vermuten, dass ein vermehrtes Auftreten der Deletion bereits in den Vorläuferzellen und Stammzellen Einfluss auf das Auftreten von sekundär proliferierten Geweben hat.

#### **5.5.2.2 Milz**

Die Milz spielt in Bezug auf die Hämatopoese des Blutes eine besondere Rolle. Während sie im Säuglings- und Kindesalter als lymphatisches Organ vor allem für die Blutbildung, insbesondere der Prägung der Lymphozyten, verantwortlich ist, ist die Milz mit zunehmendem Lebensalter dann überwiegend für den Abbau von überalterten Blutzellen verantwortlich.

In dieser Arbeit war die jüngste Person vier Jahre alt und somit auch aus dem Säuglingsalter heraus. Es ist also davon auszugehen, dass die hier untersuchten Milzproben nur einen minimalen Anteil an der Hämatopoese haben. Lediglich bei Patienten mit einem hämatopoetischen Grundleiden kommt eine adulte Form der Hämatopoese vor. Dieses Probandengut wurde, soweit es bekannt war, von dieser Untersuchung ausgeschlossen.

Im Milzgewebe fiel es in dieser Arbeit auf, dass es mit zunehmendem Lebensalter zu einer Zunahme von mitochondrialer DNA im Bezug auf die nukleäre DNA kam. Jedoch scheint es keine positive Korrelation von dem Anteil an dmtDNA zur mtDNA bezüglich einer Altersabhängigkeit zu geben. Das heißt, dass es im Milzgewebe über Jahre gesehen zu einer Zunahme von sowohl mtDNA als auch dmtDNA kommt, doch die Relation von dmtDNA zur mtDNA bleibt gleich.

Im Milzgewebe stellt sich insbesondere die Frage, welchen Zellen die hier untersuchte mtDNA entstammt. Es könnten zum einen die überalterten

Blutzellen sein, wobei der Großteil der hier abgebauten Zellen Erythrozyten sind, welche selbst weder nDNA noch mtDNA enthalten, oder es handelt sich vor allem um DNA aus Makrophagen und Reticulumzellen. Würde es sich in bei der hier untersuchten DNA um vor allem DNA aus Blutzellen handeln, müsste sich ein ähnliches Bild der Altersabhängigkeit ergeben. Im Blut scheint es eine altersabhängige Korrelation zugeben. Viel mehr müsste diese Korrelation noch sehr viel deutlicher zu Tage treten, da hier überalterte Zellen und geschädigte Zellen abgebaut werden. Andererseits kann aber postuliert werden, dass über das Lebensalter gesehen immer der gleiche Anteil an Zellen abgebaut wird und somit die Relation konstant ist.

Dies entspricht jedoch nicht den in dieser Arbeit erhobenen Daten. Hierzu werden erneut die Daten der 24- Jährigen herangezogen (vgl. Abb. 19). Das vermehrte Auftreten der Deletion in der Milz hier könnte Zeichen eines vermehrten Abbaus der mit der Deletion betroffenen Zellen sein, da im Vergleich zu Probanden anderen Alters mit einer ähnlichen Relation von dmtDNA zu mtDNA im Skelettmuskel die Deletion sich bei diesen in den übrigen Geweben nicht so ausgeprägt nachweisen lässt und vice versa das Auftreten der 4977 bp Deletion der 24-Jährigen im Skelettmuskel relativ gering ist.

Jedoch kommt es bei der Apoptose primär zu einem Abbau von DNA. Eine Nachweisbarkeit der DNA überalterter, sich in der Apoptose befindlicher Zellen scheint hierdurch erschwert. Klar ist ferner auch nicht, ob die mtDNA zum gleichen Zeitpunkt wie nDNA abgebaut wird.

## **5.6 Weitere mögliche Einflüsse auf die mitochondriale DNA**

Die mitochondriale DNA trägt insgesamt 37 Gene, die die Information der 22 tRNAs, 2 rRNAs und 13 Polypeptide enthalten (Löffler, Petrides, 1998). Jeder exogene oder endogene Einfluss auf das Individuum hat direkten oder indirekten Einfluss auf die DNA, sowie auf die mtDNA. Bei der mtDNA haben diese Einflüsse jedoch weitreichende Folgen, da ihr nicht die Vielzahl der Reparaturmechanismen zur Verfügung steht, wie der nDNA.

Weiter zu beachten, ist die räumliche Nähe der mtDNA zu oxidativen Prozessen der Mitochondrienmembran.

### **5.6.1 Schäden durch exogene Faktoren**

Es gibt viele verschiedene Faktoren, die Einfluß auf die DNA haben. Einige wurden schon genannt. Insbesondere sollen nun exogene Faktoren betrachtet werden, die zum einen Einfluß auf die DNA selbst haben, aber auch solche, welche die Zellzahl und somit auch die DNA indirekt beeinflussen. Die Schädigungsformen sind komplex und nicht einfach voneinander zu trennen. Zigarettenkonsum bewirkt so zum einen eine Leukozytose, daher ist bei solche Probanden quantitativ mehr DNA enthalten, zum anderen treten hier auch mehrere Mutationen und Deletionen auf durch die in Zigaretten enthaltenen Stoffe. Zu nennen ist hier beispielsweise das Polonium. Ein  $\alpha$ - Strahler, der bei Inkorporation zu Dimerisierung von Basen, zur Bildung von Pyrimidinhydraten und Strangbrüche führt. Bei der Strahlenexposition unterscheidet man natürliche (1,2mSv/a) (kosmische 0,3mSv/a; terrestrische 0,4mSv/a, Ingestions- 0,3mSv/a, Inhalationsstrahlung 0,2mSv/a und die zivilisatorische Strahlenexposition (0,9mSv/a). Welche Wirkung Strahlung auf den Organismus hat, ist stark abhängig von dem bestrahlten Gewebe. Gewebe mit einer hohen Replikationsrate (z.B. Darm und Haut) sind stark gefährdet, aber noch stärker gefährdet sind das hämatopoetische System und die Keimdrüsen. Sie kann sich direkt auf die DNA auswirken (UV-Strahlung wird von Nukleinsäuren absorbiert). Es kommt dabei zur Dimerisierung von Basen, zur Bildung von Pyrimidinhydraten etc. Aber auch Strangbrüche werden hervorgerufen. Zum anderen haben gebildete Sauerstoffradikale, auf die im nächsten Kapitel genauer eingegangen wird, ihrerseits wieder indirekt schädigende Wirkung auf das genetische Material.

Auch chemische Substanzen können DNA- Schäden hervorrufen. So führt salpetrige Säure ( $\text{HNO}_2$ ) zur Desaminierung. Nicht alle mutagenen

Substanzen, die dem Organismus zugefügt werden, sind sofort als Mutagen wirksam. Zu ihnen zählen das Nitrosamin und das Benzpyren. Beides Bestandteile im Zigarettenrauch, die erst durch Umsetzung im Organismus zu Mutagenen werden. Polycyclische Kohlenwasserstoffe und andere schwer lösliche organische Verbindungen werden im endoplasmatischen Reticulum (SER) enzymatisch oxidiert. Dadurch werden sie aktiviert und es entstehen gleichzeitig aggressive Sauerstoffradikale. Die aktivierten Kohlenstoffe können mit der DNA reagieren und wirken kanzerogen. Alkylierende Substanzen (Methylgruppen, Ethylgruppen) bewirken Strangbrüche im Zuge der Reparatur im DNA-Strang.

Des Weiteren können Viren die DNA verändern, indem sie ihre DNA oder RNA in die Zell-DNA einbauen.

Von Mansauri et al. wurde 2001 die Wirkung von Alkohol auf Gehirn, Herz, Skelettmuskel und Leberzellen untersucht. Bei den alkoholintoxikierten Mäusen fand sich zunächst ein Abfall und anschließend ein kompensatorischer Anstieg der mtDNA. Aussagen über die 4977 bp-Deletion wurden hier nicht gemacht. Tsuchishimia et al. (2000) untersuchten die mtDNA-Deletion in Leukozyten nach Alkoholkonsum. Es kam hierbei nach einigen Tagen zum Rückgang der Heteroplasie. Dies war jedoch nur bei Probanden mit alkoholtoxisch veränderter Leber beobachtet worden. Gesunde Probanden zeigten dies nicht. Chronischer Alkoholabusus erhöht die Aktivität des Cytochrom p450 in der Leber. Dies erhöht hierdurch wieder den oxidativen Stress (Rashba-Slep, Turro and Cederbaum, 1993). Zusammenfassend ergab sich aus der Arbeit von Chahil, Wang und Hoek (1997), dass chronischer Alkoholabusus das Auftreten von oxidativ veränderter mtDNA im Lebergewebe begünstigt.

Es wäre also denkbar, dass Alkohol auch einen negativen Einfluß auf die mtDNA im Blut und der hier untersuchten Gewebe ausübt (von Wurmb-Schwark et al., 2007).

### 5.6.2 Schäden durch endogene Faktoren

Endogene Schäden der DNA werden vor Allem verursacht durch körpereigene Stoffwechselprodukte. Diese sowie exogene Einflüsse führen zur Bildung von freien Radikalen und reaktivem Sauerstoff (reactive oxygen species, ROS). Als ROS werden radikalische und nichtradikalische Sauerstoffderivate bezeichnet, die eine sehr hohe Reaktivität besitzen. Hierzu gehören das Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}^-$ ), das Superoxidanion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), das Peroxylradikal ( $\cdot\text{ROO}^-$ ), Wasserstoffperoxyd ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). ROS werden bei verschiedenen enzymatischen Reaktionen, z.B. durch die Xanthin-Oxidase, die NAD(P)H-Oxidase, die NO-Synthase oder durch Peroxidasen in der Zelle gebildet. Eine weitere Quelle ist die mitochondriale Atmungskette (Shigenaga et al.; 1994). Insbesondere ihre räumliche Nähe zur mtDNA verursacht einen Großteil der mtDNA-Schäden. Das hoch reaktive Peroxynitrit ( $\text{OONO}^-$ ) entsteht durch eine Reaktion des Superoxidanions und des Stickstoffmonoxid (NO). Dieses zählt, wie Stickstoffmonoxid und -dioxid zu den reaktiven Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS) (Guo et al.; 2003; Rhee et al.; 1994). ROS lösen mit Nichtradikalen eine Kettenreaktion aus, die die Anreicherung von nichtphysiologischen Radikalen fördert. Hierdurch kommt es zu einem Missverhältnis von prooxidativen Faktoren und antioxidativen Mechanismen. Dies verursacht oxidativen Stress. ROS können mit Makromolekülen in Wechselwirkung (auch DNA) treten. Sie sind fähig diese zu schädigen indem sie sie strukturell und funktionell verändern. Dadurch kommt es zu DNA-Basenmodifikationen und DNA-Strangbrüchen, Lipidoxidationen, Membranschäden, Proteinspaltungen sowie Kohlenhydratmodifikationen (Davies, 1995). Abgesehen von der schädigenden Wirkung haben ROS durchaus positive Eigenschaften. Sie sind an der Pathogenbekämpfung phagozytischer Zellen beteiligt, dienen als sekundäre Botenstoffe und fungieren als chemotaktische Faktoren bei Entzündungsprozessen (Finkel; 1998; Rhee; 1999).

Dieser oxidative Stress wird von einigen Autoren als Hauptursache des Auftretens der 4977 bp Deletion genannt. So könnte man erklären warum trotz gleichen Alters es zu unterschiedlichem Auftreten der 4977bp Deletion kommt (vgl., Abb. 19). Menschen die antioxidative Enzyme (Superoxiddismutasen, Katalasen, Peroxidasen) oder nicht-enzymatischen Antioxidantien (Glutathion, Thioredoxin $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure,  $\beta$ -Carotin, sekundäre Pflanzenstoffe) vermehrt bilden oder zu sich nehmen sind somit besser geschützt.

Somit kann das vermehrte Auftreten der 4977 bp Deletion im Laufe des Lebens nicht als Alterungsprozess an sich, sondern als Folge von Einflüssen von oxidativen Prozessen und Antioxidantien verstanden werden.



## **6 Zusammenfassung**

Die 4977 bp Deletion (common deletion) ist die häufigste Deletion der mitochondrialen DNA. Ihr Auftreten wurde in vielen Vorarbeiten in verschiedenen Geweben detektiert.

In dieser Arbeit wurde die Deletion im Gegensatz zu vielen Vorarbeiten bereits bei Personen unter 20 Jahren nachgewiesen. Dies gelang für alle untersuchten Gewebe (Milz, Knochenmark, Skelettmuskel und Blut).

Mit dieser Untersuchung sollte überprüft werden, ob das Auftreten der 4977 bp Deletion als Prozess des Alterns selbst zu verstehen ist. Dies konnte nicht nachgewiesen werden. Lediglich im Skelettmuskelgewebe fand sich mit zunehmendem Alter ein relevanter Anstieg der 4977 bp Deletion. Wohingegen das relative Verhältnis von mitochondrialer DNA zur nukleären DNA konstant blieb.

Für die untersuchten Blutproben ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Es kam hier zu einer geringen Zunahme der Deletion im Bezug auf das Lebensalter, jedoch auch zu einer geringen Zunahme der mitochondrialen DNA bezüglich der nukleären DNA.

Für Milz und Knochenmark konnte keine altersabhängige Zunahme der 4977 bp Deletion gefunden werden. Vielmehr zeigte sich, dass vermutlich ein vermehrtes Auftreten der 4977 bp Deletion schon in den Stammzellen und Vorläuferzellen ein vermehrtes Auftreten der Deletion im ausdifferenzierten Gewebe nach sich zog.

In dieser Arbeit ist zu bemerken, dass das Extraktionsverfahren keinen Einfluss auf die Qualität und die relative Quantität der dmtDNA, mtDNA und nDNA hat.

Die 4977 bp- Deletion ist somit weniger als Alterungsprozess zu verstehen, vielmehr als Folge von verschiedenen Einflussfaktoren. Viele Arbeiten haben den Einfluss von exogenen Faktoren untersucht. Am

wichtigsten scheint der Einfluss von oxidativen Prozessen auf das Auftreten der 4977 bp Deletion zu sein. Gründe hierfür sind die räumliche Nähe zu den oxidativen Prozessen der Mitochondrienmembran und die im Vergleich zu der nukleären DNA weniger ausgefeilten Reparaturmechanismen. Interindividuelle Unterschiede ergeben sich durch den Lifestyle (Alkohol- und Zigarettenkonsum) und individuellen Stress.

## **7 Anhang**

### **7.1 Geräte**

DNA-Extraktion:

- Thermomixer 5436, EPPENDORF
- Vortex 2-Genie, SCIENTIFIC INDUSTRIES
- Germani Twin Shaking Water Bath, ROBBINS SCIENTIFICS®
- Centrifuge 5415C, EPPENDORF
- Megafuge 1.0, HERAEUS INSTRUMENTS

Agarose-Gelelektrophorese:

- Mini-Elektrophoresekammer, ROTH
- Horizon 11.14, LIFE TECHNOLOGIES
- Spannungsgerät 2197 Power Supply CKB, BROMMA
- Gel Doc EQ, BIO-RAD
- UV-Lampe, UVT2035, HEROLAB
- Magnetrührer, IKAMAG RCT

Photometrie:

- Photometer, Lange
- Glasküvetten

PCR:

- Thermocycler Gene Amp® PCR System 2700, APPLIED BIOSYSTEMS
- Template Taner, CONCOR

Fragmentanalyse:

- ABI PRISM™310 Genetic Analyser, APPLIED BIOSYSTEMS
- Apple® Power Macintosh Computer mit Mac OS, Apple
- GeneScan® Analysis Software Version 3.1.2, APPLIED BIOSYSTEMS
- 310 Kapillaren für Fragmentanalyse 47 cm x 50 µm ID, APPLIED BIOSYSTEMS

### **7.2 Verbrauchsmaterialien**

- Reaktionsgefäße 1,5 ml, EPPENDORF
- Reaktionsgefäße 50 ml
- Reaktionsgefäße 0,2 ml, SARSTEDT
- Genetic Analyser 0,5 ml SampleTubes, APPLIED BIOSYSTEMS
- Gummisepta, APPLIED BIOSYSTEMS

**7.3****Chemikalien**

- Ammoniumchlorid, MERCK
- AgaroseSeaKem® ME, BMA
- Borsäure, SIGMA
- Bromphenolblau 0,5%, MERCK
- Dimethylsulfooxid (DMSO), QBIOGEN
- Dithiothreitol (DTT), SIGMA
- DNA-Extraktionskit Super Quick Gene, IMMUCOR
- dNTPs, Bioline
- EDTA, MERCK
- Ethanol 99,9%, Roth
- Ethidiumbromid (10 mg/ml), INVITROGEN
- Formamid, GIBO
- Genomic DNA Purification Kit, PUREGENE®
- Hyperladder™ I (Leiter), BIOLINE
- Hyperladder™ IV (Leiter), BIOLINE
- Immobuffer 10x, BIOLINE
- Isopropanol, FLUKA
- Immobilase 5u/µl, BIOLINE
- Kaliumhydrogencarbonat, MERCK
- Lysispuffer (16,52 g NH<sub>4</sub>Cl, 2 g KHCO<sub>3</sub>, 0,084 g EDTA ad 200 ml a.dest.)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM, Bioline
- Natriumacetat, MERCK
- Natriumchlorid, MERCK
- Natriumdodecylsulfat (SDS), FLUKA
- Primer (β-Globin; L15/H16;35/H45), ROTH
- Proteinase K, APPLIED BIOSYSTEMS
- Sodumdodecylsulfat, MERCK
- Standard: Gene Scan™-500 ROX™ Size Standard, APPLIED BIOSYSTEMS
- Super Quick Gene Kit , Immucor
- TBE 1x/ 5x (890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, 890 mM TrisHCl, auf pH 8,3 einstellen.)
- TE-Puffer (10 mM Tris, 0,2 mM EDTA, auf pH 7,5 einstellen.)
- TEN-Puffer (1M Tris mit HCl auf pH 8 einstellen, 5 M NaCl, 0,5 M EDTA,.)

## 7.4 Ansatz und Vorbereitung der Lösungen und Reagenzien

- **Agarosegel-Lösung:** 1% bzw. 3% Agarose in 1x TBE geben, aufkochen, 0,1% Ethidiumbromid hinzugeben, in Gelwanne gießen, Kämmen einsetzen, ca. 30 min. bei RT auspolymerisieren lassen
- **DTT:** zu 1 M 100 µl 1M Natriumacetat geben, in 250 µl Aliquots teilen, bei -20°C lagern
- **Ethidiumbromid:** 1%, lichtgeschützt bei 4°C
- **Leiter für Agarosegele:** Leitern mit 1 x TBE verdünnen, 1:3 mit Farbe versetzen, bei -20°C lagern, 200 ng/lane auftragen
- **Lysis-Puffer (10 fach konz.):** 16,52 g NH<sub>4</sub>Cl, 2 g KHCO<sub>3</sub>, 0,084 g EDTA ad 200 ml a.dest., bei 4°C lagern
- **PBS:** 0,85% NaCl, 0,03% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,11 %Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, auf pH 7,3 einstellen, bei 4°C lagern
- **Proteinase K-Lösung:** 1%Proteinase K in Proteinase K-Puffer, bei -20°C lagern
- **Proteinase K-Puffer:** 2 M EDTANa<sub>2</sub>, 1%SDS
- **TBE-Puffer (10 x):** 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, 890 mM TrisHCl, auf pH 8,3 einstellen
- **TE-Puffer (Tris-EDTA):** 10 mM Tris, 0,2 mM EDTA, auf pH 7,5 einstellen
- **TEN-Puffer:** 1M Tris mit HCl auf pH 8 einstellen, 5 M NaCl, 0,5 M EDTA,
- **Sodiumdodecylsulfat (SDS):** 20%-ig

Alle Lösungen werden mit Aqua bidest, wenn nicht anders angegeben, angesetzt.

## 7.5 Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
del	Deletion
dmtDNA	deletierte mtDNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxynukleosid-Triphosphat
g	Erdbeschleunigung/ Gramm
G	Guanin
h	Stunde
Lsg.	Lösung
mA	Milliampère
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mtDNA	mitochondriale DNA
NADP	Nicotinamidadeninnucleotidphosphat
nDNA	nukleäre DNA
PPR	Proteinpräzipitierendes Reagenz
R	Reinheit von DNA-Lsg.in der Photometrie
RBC	Erythrozyten-Lysepuffer (red blood cell buffer)
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunde
T	Thymin
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WBC	Leukozyten-Lysepuffer (white blood cell buffer)
wtDNA	undeletierte mtDNA

## 7.6 Tabellen

**Tabelle 3: Temperaturprofil der Duplex PCR**

Art	Temperatur	Dauer
Vorheizen	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	1 min
Annealing	55°C	1 min
Extension	72°C	2 min
<b>Zyklenzahl</b>	35	
Endextension	20°C	∞

**Tabelle 4: Ansatz für PCR wt/nukleäre DNA**

Volumen ges. 12,5 µl	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im PCR- Ansatz
0,1 µl 0.0625 µ	Immolase 5 U/ml L15/H16 Primer je 10 mM	1 U 1,25 mM
0,25 µl	β-Globin Primer 10 mM	2,5 mM
0,2 µl	dNTPs je 10 mM	20 µM
0,5 µl	DMSO 100%	2%
0,375 µl	Mg <sup>2+</sup> 25 mM	0,375 µM
1,25 µl	PCR-Puffer 5 x	0,5 x
8,76 µl	Aqua bidest	-
1 µl	DNA-Lsg. 10 ng/ml	10 ng

**Tabelle 5: Ansatz für PCR wt/ del. DNA**

Volumen ges. 12,5 µl	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im PCR- Ansatz
0,1 µl 0.0625 µ	Immolase 5 U/ml L15/H16 Primer je 10 mM	1 U 1,25 mM
0,25 µl	L35/H45 Primer je 10 mM	5 mM
0,2 µl	dNTPs je 10 mM	20 µM
0,5 µl	DMSO 100%	2%
0,375 µl	Mg <sup>2+</sup> 25 mM	0,375 µM
1,25 µl	PCR-Puffer 5 x	0,5 x
8,76 µl	Aqua bidest	-
1 µl	DNA-Lsg. 10 ng/µl	10 ng

**Tabelle 6: Ansatz für Fragmentanalyse**

<b>Volumen ges. 13 µl</b>	<b>Stammlösung</b>
0,5 µl 11,5µl 1 µl	ROX 500 Formamid PCR-Produkt

**Tabelle 7: Untersuchte Proben der Leichen unter Zuordnung von Geschlecht und Alter**

<b>Probe</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Probe</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>
01	w	82	30	m	46
02	w	89	31	w	80
03	m	50	32	m	78
04	m	17	33	m	67
05	m	41	34	w	13
06	w	51	35	m	44
07	m	60	36	w	40
08	w	39	37	w	40
09	m	29	38	m	22
10	w	64	39	m	49
11	w	55	40	m	80
12	w	73	41	w	83
13	m	54	42	w	77
14	m	80	43	w	4
15	m	52	44	m	38
16	w	68	45	m	24
17	w	28	46	m	36
18	w	49	47	m	52
19	m	77	48	w	67
20	m	54	49	m	75
21	w	62	50	m	68
22	m	52	51	w	91
23	w	15	52	m	73
24	m	33	53	w	52
25	m	47	54	m	60
26	m	41	55	m	37
27	m	45	56	m	39
28	m	42	57	m	80
29	w	14			



**Tabelle 8- 13: Fragmentgrößen der Kapillarelektrophorese ermittelt mittels ABI PRISM™ 310 GeneZic Analyser:**

**Tabelle 8: mtDNA/nDNA im Blut:**

Probe	Alter	1µl pur 0,9375µl β-Globin	wmtDNA
01_03	82	79347	77196
02_03	89	88097	61581
03_03	50	75203	40959
04_03	17	65643	33782
05_03	41	149764	57465
06_03	51	111332	62802
07_03	60	126200	50545
08_03	39	111240	50324
09_03	29	90967	44808
10_03	64	20006	4018
11_03	55	45002	5649
12_03	73	88158	42559
13_03	54	99421	82186
14_03	80	140743	94827
15_03	52	90502	75190
16_03	68	101521	80989
17_03	28	87017	42729
18_03	49	2799	0
19_03	77	90184	100634
20_03	54	105991	451296
21_03	62	55090	47242
22_03	52	0	0
23_03	15	137389	98610
24_03	33	90431	76732
25_03	47	73690	77952
26_03	41	1968	1038

Probe	Alter	1µl pur 0,9375µl β-Globin	wmtDNA
27_03	45	60950	21730
28_03	42	83343	2989
29_03	14	71725	24527
30_03	46	60685	34742
31_03	80	71092	55053
32_03	78	57957	43744
39_03	49	55673	34835
40_03	80	76883	108413
41_03	83		
42_03	77	89643	52432
43_03	4	84221	16900
44_03	38	162338	139137
45_03	24	99179	118615
46_03	36	86087	86054
47_03	52	17010	2735
48_03	67	112437	71206
49_03	75	51242	5653
50_03	68	106625	38665
51_03	91	128051	107116
52_03	73	12376	12720
53_03	52	86359	38475
54_03	60	70107	41046
55_03	37	71669	11093
56_03	39	95247	41966
57_03	80	94061	6459

**Tabelle 9: dmtDNA/wtmtDNA in Blut:**

Probe	Alter	dmtDNA	wtmtDNA
01_03	82	11501	22260
02_03	89	2044	6670
03_03	50	10240	34322
04_03	17	0	39215
05_03	41	1060	9517
06_03	51	786	22744
07_03	60	105978	137862
08_03	39	0	42323
09_03	29	0	47741
10_03	64	2242	8897
11_03	55	0	3869
12_03	73	31109	55200
13_03	54	11625	130615
14_03	80	51764	69531
15_03	52	544	45608
16_03	68	4857	53821
17_03	28	0	17734
18_03	49	4172	48412
19_03	77	10038	63467
21_03	62	3626	63913
22_03	52	1839	100719
23_03	15	0	58326
24_03	33	0	17608
26_03	41	1938	0
27_03	45	3401	66654
28_03	42	1766	37184

Probe	Alter	dmtDNA	wtmtDNA
30_03	46	0	49401
31_03	80	10821	53432
32_03	78	5236	32728
33_03	67	8606	178130
34_03	13	0	123092
35_03	44	14418	45155
36_03	40	26131	66125
37_03	40	35657	164857
38_03	22	34087	171446
39_03	49	24765	61021
40_03	80	60165	78882
41_03	83	10389	148462
42_03	77	0	47706
43_03	4	0	32921
44_03	38	0	16679
45_03	24	0	31646
46_03	36	0	37966
47_03	52	10727	136739
48_03	67	8898	196651
49_03	75	32481	98564
50_03	68	2452	51171
51_03	91	60893	198908
53_03	52	373	2699
54_03	60	2044	36533
56_03	39	1433	31904

**Tabelle 10:**  
**mtDNA/nDNA in der Milz:**

Probe	Alter	1µl 1:100 0,25µl β-Globin	wmtDNA
01_03	82	76710	69763
02_03	89	88695	61500
03_03	50	112095	62008
04_03	17	112519	73880
05_03	41	149237	64739
06_03	51	134067	86725
07_03	60	179342	219778
08_03	39	89251	1886
09_03	29	111159	62339
10_03	64	65293	35222
11_03	55	82736	32539
12_03	73	98855	107509
13_03	54	102003	70500
14_03	80	105730	72140
15_03	52	95453	67842
16_03	68	125971	104992
17_03	28	57581	22770
18_03	49		
19_03	77	174333	280346
20_03	54	170198	143308
21_03	62	140536	7989
22_03	52	89490	64547
23_03	15	118812	88807
24_03	33	115185	84398
25_03	47	124358	90890
26_03	41	104656	10816
27_03	45	38336	0
28_03	42	85580	30940
29_03	14	81994	5030
30_03	46		
31_03	80	108170	58742
32_03	78	121859	157413
33_03	67	144593	158513
34_03	13	87114	6213
35_03	44	98674	52446
36_03	40	141933	121408
37_03	40	90759	1336
40_03	80	122854	107268

**Tabelle 11:**  
**dmtDNA/wtmtDNA in der Milz:**

Probe	Alter	dmtDNA	wmtDNA
03_03	50	4203	6204
04_03	17	0	64502
06_03	51	1264	3841
07_03	60	17901	35968
08_03	39	1949	36990
09_03	29	3529	29536
11_03	55	5057	45310
13_03	54	42719	46647
14_03	80	60625	296574
15_03	52	0	13591
16_03	68	8187	20416
17_03	28	0	41213
19_03	77	0	11310
21_03	62	2042	30024
22_03	52	18687	125913
23_03	15	10104	23863
24_03	33	0	70395
25_03	47	2804	28997
26_03	41	0	2712
30_03	46	2742	41254
31_03	80	0	24523
32_03	78	7566	56328
33_03	67	17911	52038
34_03	13	0	65897
36_03	40	16409	51054
39_03	49	0	13251
40_03	80	0	4200
41_03	83	60909	81329
42_03	77	0	16581
43_03	4	0	69924
44_03	38	26026	62065
45_03	24	16565	42608
46_03	36	13033	19344
49_03	75	137505	128575
50_03	68	42586	49303
51_03	91	41624	197727
52_03	73	24173	58338
53_03	52	30934	53844
54_03	60	54231	152518
55_03	37	41147	69042
56_03	39	9743	14028
57_03	80	53537	236020

**Tabelle 12:**  
**mtDNA/nDNA im Knochen-**  
**mark:**

Probe	Alter	1µl 1:100 0,25µl β-Globin	wmtDNA
01_03	82	69860	1228
02_03	89	119719	53998
03_03	50	75453	30086
04_03	17	94118	70331
05_03	41	147632	57693
06_03	51	134474	76831
07_03	60	124063	75627
08_03	39	105592	85448
09_03	29	116952	82941
10_03	64	128065	77823
11_03	55	71346	72741
12_03	73	107739	109153
13_03	54	67504	97080
14_03	80	129180	102329
15_03	52	127478	104314
16_03	68	118635	96951
17_03	28	23004	4562
18_03	49	71226	0
19_03	77	144784	38355
20_03	54	127107	35476
21_03	62	126186	105826
22_03	52	41217	4157
23_03	15	75668	40478
24_03	33	132775	90834
25_03	47	105105	79615
26_03	41		
27_03	45	13355	0
28_03	42	104721	70589
29_03	14	119595	42406
30_03	46	141787	42832
31_03	80	65933	12828
32_03	78	141475	171135
33_03	67	152744	134745
34_03	13	119785	100234
35_03	44	0	100691
36_03	40	84086	18925
37_03	40	81056	1208
38_03	22	90172	9170
39_03	49	59309	14133
40_03	80	116038	81942

**Tabelle 13:**  
**dmtDNA/wmtDNA im**  
**Knochenmark:**

Probe	Alter	dmtDNA	wmtDNA
01_03	82	1364	44583
02_03	89	0	4207
03_03	50	11260	42305
04_03	17	0	56814
06_03	51	17657	47607
07_03	60	18274	46752
08_03	39	9495	15686
10_03	64	16517	62657
11_03	55	731	1194
14_03	80	10312	12194
15_03	52	1158	10956
16_03	68	30571	64753
17_03	28	0	6863
18_03	49	23157	11950
19_03	77	0	1233
21_03	62	10828	25333
22_03	52	4592	6794
23_03	15	0	33604
24_03	33	0	50497
26_03	41	0	33666
30_03	46	0	8795
31_03	80	0	8097
32_03	78	3663	28917
33_03	67	1169	33459
34_03	13	0	5610
35_03	44	0	3735
36_03	40	3086	37241
37_03	40	0	15182
38_03	22	0	39748
39_03	49	3309	34552
40_03	80	59243	31056
41_03	83	0	1576
42_03	77	0	40246
43_03	4	0	8752
44_03	38	41341	68235
45_03	24	26708	40880
46_03	36	51474	275503
48_03	67	7113	147542
49_03	75	4920	18717
56_03	39	1200	242024
57_03	80	46731	120020

**Tabelle 14:**  
**mtDNA/nDNA im**  
**Skelettmuskel:**

Probe	Alter	1µl 1:100 0,25µl β-Globin	wmtDNA
01_03	82	82756	31211
02_03	89	99274	24176
03_03	50	105919	39156
04_03	17	107346	69127
05_03	41	147465	72282
06_03	51	20219	11030
07_03	60	18868	1242
08_03	39	95524	12960
09_03	29	46149	15023
10_03	64	73196	33087
11_03	55	64069	34922
12_03	73	66827	13873
13_03	54	58063	14006
14_03	80	135099	88162
15_03	52	74182	106067
16_03	68	19481	11600
17_03	28	16264	19943
18_03	49	100448	191476
19_03	77	119472	144341
20_03	54	143323	2271
21_03	62	92837	37541
22_03	52	76661	53301
23_03	15	84044	46101
24_03	33	109708	75702
25_03	47	86743	11930
29_03	14	111490	60321
30_03	46	103980	109469
31_03	80	96823	90175
32_03	78	104682	94285
33_03	67	127707	158697
34_03	13	79410	25564
35_03	44	89150	34500
36_03	40	106491	59141
37_03	40	75586	12489
38_03	22	82223	28586
39_03	49	77724	117656

**Tabelle 15:**  
**dmtDNA/wmtDNA im**  
**Skelettmuskel:**

Probe	Alter	dmtDNA	wmtDNA
01_03	82		
02_03	89	30566	5434
03_03	50	3692	59584
04_03	17	0	80699
07_03	60	40277	17897
09_03	29	0	8867
10_03	64	6539	10298
14_03	80	173162	332567
15_03	52	0	7423
19_03	77	0	30568
20_03	54	0	2076
23_03	15	0	2389
25_03	47	1972	61462
26_03	41	0	5073
29_03	14	0	7083
30_03	46	1956	47521
31_03	80	61487	13549
32_03	78	27186	7776
33_03	67	22059	41378
34_03	13	0	1584
36_03	40	59054	81465
40_03	80	21539	8196
41_03	83	307028	51732
42_03	77	6758	39371
43_03	4	2792	39594
44_03	38	49398	374026
45_03	24	50805	338170
46_03	36	46724	309134
47_03	52	94521	33254
49_03	75	48686	28040
50_03	68	324696	48030
51_03	91	367853	58234
52_03	73	290601	42400
53_03	52	42400	290601
54_03	60	349608	48451
55_03	37	55159	348459
56_03	39	36505	200116
57_03	80	334795	174555

## 7.7 Statistik:

### Pearsons Korrelationskoeffizient:

Der Korrelationskoeffizient  $r$  (auch Produktkorrelation nach Pearson genannt) wird berechnet durch:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Der Korrelationskoeffizient kann einen Wert zwischen -1.0 und +1.0 annehmen.

## 8 Literatur

### **ABI Prism®310 Genetic Analyzer User`s Manual (1997)**

Applied Biosystems

**Alberts, B.;** Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.(1990)  
Molekularbiologie der Zelle , 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft,  
Weinheim

### **Ames, B.N.** (1989)

Endogenous DNA damage is related to cancer and aging, Mut. Res. 214:  
41-46

### **Ames, B.N.;** Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. (1992)

Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging, Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 90: 7915-7922

### **Anderson, S.;** Bankier, A.T.; Barrel, B.G. et al (1981)

Sequence and organisation of human mitochondrial genom, Nature 290:  
456-465

### **Arnheim, N.;** Cortopassi G.(1992)

Deletion mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues,  
Mutat Res 275 (3-6):157-167

### **Bai, R.-K.;** Perng, C.-L.; Hsu, C.-H.; Wong, L.-J. (2004)

Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with  
mitochondrial disease, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1011: 304-309

### **Bailey, S.H.** (2003)

A Review of the role of Reactive Oxygen an Nitrogen Species in Alcohol-  
induced Mitochondrial Dysfunction, Free Radical Research: 1-12

### **Bailey, S.H.;** Cunningham, C.C. (2002)

Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic  
liver disease, Free Radical Biology & Medicine, Vol.32 1 11-16

### **Ballinger, S.W.;** Boudier, T.G.; Davis, G.s.; Judice, S.A.; Albertini, R.J. (1996)

Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking, Cancer  
Res. 56: 5692-5700

### **Ballinger, S.W.;** Shoffner, J.M.; Hedays, E.V.; Trounce, I.; Polaak, M.A.; Koontz, D.A.; Wallace, D.C. (1992)

Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10,4 kb  
mitochondrial DNA deletion, Nat. Genet. 1:11-15

### **Banas, B.;** Kast, B.B.; Goebel, F.D. (2004)

Plates, atypical source of error in real time PCR quantification of  
mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells, Eur.J. Med.  
Res. 2004 Aug 31, 9(8): 371-2

### **Baumer, A.;** Zhang, C.; Linnane, A.W.; Nagley, P. (1994)

Age-related human mtDNA deletions: A heterogeneous set of deletions  
arising at a single pair of directly repeated sequences, Am. J. Hum. Genet.  
54: 618-630

### **Barja, G.** (2000)

The flux of free radikal attack through mitochondrial DNA is related to  
aging, Aging (Milano) 12 (5): 342-355

- Barazzoni, R.;** Short, K.R.; Nair, K.S. (2000)  
Effects of Aging on Mitochondrial DNA Copy Number and Cytochrome c Oxidase Gene Expression in Rat Skeletal Muscle, Liver and Heart, *J.Biol.Chem* 275: 3343-3347
- Barrientos, A.;** Csaademont, J.; Cardellach, F.; Estivill, X.; Urbano-Marquez, A.; Nunes, V. (1997)  
Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging, *Mol. Brain Res.* 52: 284-289
- Benninghoff;** 15. Auflage ©Urban& Schwarzenberg (1994)  
Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen
- Berdainier, C.D.;** Everts, H.B. (2001)  
Mitochondrial DNA in aging and degenerative disease, *Mut. Res.* 475: 169-184
- Berneburg, M.;** Plettenberg, H.; Medve-Konig, K.; Pfahlenberg, A.; Gers-Barlag, H.; Gefeller, O.; Krutmann, J.  
Introduction of photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in human skin, *J Invest Dermatol.* 122 (5): 1277-1283
- Bogenhagen, D.;** Clayton, D.A. (1974)  
The number of mitochondrial desoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells, *J.Biol.Chem* 249: 7991-7995)
- Bohlega, S.;** Tanji, K.; Santorelli, F.M.; Hirano, M.; al-Jishi, A.; DiMauro, S. (1996)  
Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy, *Neurology* 46: 1329-1334
- Borras, C.;** Sastre, J.; Gracia-Sala, D.; Lloret, A.; Pallardo, F.V.; Vina, J. (2003)  
Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males, *Free radic Biol Med.* 1; 34(5): 546-552
- Botto, N.;** Berti, S.; Manfredi, S.; Al-Jabri, A.; Tederici, C.; Clerico, A.; Ciofini, E.; Biagini, A.; Andeassi, M.G. (2005)  
Deletion of mtDNA with 4977bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery diseases, *Fundamental molekulare Mechanismen der Mutagenese* 570:181-188
- Brown, M.W.;** George, M.; Wilson, A.C. (1979)  
Rapid evolution of animal mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971
- Cahill, A.;** Wang, X.; Hoek, J.B. (1997)  
Increased Oxidative Damage to Mitochondrial DNA Following Chronic Ethanol Consumption, *Biochem. and Biophys. Res. Communication* 235: 286-290
- Cederbaum, A.** (1999)  
Effects of Alcohol on Hepatic Mitochondrial Function and DNA, *Gastroenterology* 117: 265-269



- Clayton, D.A.;** Doda, J.N.; Friedberg, E.C. (1974)  
The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2777-2981
- Coleman, W.B.;** Cunningham, C.C. (1990)  
Effects of chronic ethanol consumption on the synthesis of polypeptides encoded by the hepatic mitochondrial genome, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1019: 142-150
- Corall-Debrinski, M.;** Shoffner, J.M.; Lott, M.; Wallace, D.C. (1992 a)  
Association of mtDNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease, *Mut. Res.* 275: 169-180
- Corall-Debrinski, M.;** Horton, T.; Lott, M.; Shoffner, J.M.; Flint Beal, M.; Wallace, D.C. (1992 b)  
Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age, *Nature Genomics* 2: 324-328
- Cortopassi, G.A.;** Arnheim, N. (1990)  
Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans, *Nucleic Acids Res* 18(23): 6927-6933
- Cortopassi, G.A.;** Shibata, D.; Arnheim, N. (1992)  
A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7370-74
- Cortopassi, G.A.;** Wang, E. (1995)  
Modelling the effects of age-related mtDNA mutation accumulation; complex I deficiency, superoxide and cell death, *Biochim Biophys Acta* 1271:171-176
- Cortopassi, G.A.;** Wong, A. (1999)  
Mitochondria in organismal aging and degeneration, *Biochim Biophys Acta* 1410:183-193
- Côté, H.C.F.;** Yip, B.; Asselin, J.J.; Chan, J.W.; Hogg, R.S.; Harrigan, P.R.; O`Shaughnessy, M.V.; Montaner, J.S.G. (2003)  
The journal of Infectious Diseases 187:1972-1976
- Demeilliers, C.;** Maisonneuve, C.; Grodet, A.; Mansouri, A.; Nguyen, R.; Tinel, M.; Lettéron, P.; Degott, C.; Feldmann, G.; Pessayre, D.; Formenty, B. (2002)  
Impaired Adaptive Resynthesis and Prolonged Depletion of Hepatic Mitochondrial DNA After Repeated Alcohol Binges in Mice, *Gastroenterology* 123:1278-1290
- Fahn, H.-J.;** Wang, L.-S.; Kao, S.-H.; Chang, S.-C.; Huang, M.-H. (1997)  
Smoking-Associated Mitochondrial DNA Mutations and Lipid Peroxidation in Human Lung Tissues, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 901-909
- Fenton, W.A.** (1995)  
Mitochondrial protein transport- a system in search of mutations, *Am. J. Hum. Genet.* 57: 235-238
- Finkel, T.** (1998)  
Oxygen radicals and signaling, *Curr Opin Cell Biol.* 10: 248-253
- Fisher, A.B.;** Dodia, C.; Manevich, Y; Chen, J.W.; Feinstein, S.I. (1999)  
Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase, *J. Biol. Chem.* 274: 21326-21334

- Formenty, B.;** Grimbert, S.; Mansouri, A.; Beaugrand, M.; Erlinger, S.; Rötting, A.; Pessayre, D. (1995)  
Hepatic Mitochondrial DNA Deletion in Alcoholics: Association With Microvesicular Steatosis, *Gastroenterology* 108: 193-200
- Formenty, B.;** Pessayre, D. (1997)  
Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis  
Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines, *J.Hep.* 26:43-53
- Formenty, B.;** Pessayre, D. (1995)  
Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity, *Pharmacol. Ther.* 67(1): 101-154
- Gadaleta, M.N.** (1995)  
Aging and mitochondrial genome, *Aging Clin. Exp. Res.* 7:469
- Gadaleta, M.N.;** Rainaldi, G.; Lezza, A.M.S.; Milella, F.; Fracasso, F.; Cantatore, P. (1992)  
Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats, *MUT. Res.* 275: 181-193
- Gattermann, N.;** Berneburg, M.; Heinisch, J., Aul, C.; Schneider, W. (1995)  
Detection of the aging-associated 5-kb common deletion of mitochondrial DNA in blood and bone marrow of hematologically normal adults. Absence of the deletion in clonal bone marrow disorders, *Leukemia* 9: 1704-1710
- Giles, R.E.;** Blanc, H.; Cann, H.m.; Wallace, D.C. (1980)  
Maternal inheritance of human mitochondrial DNA, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 77:6715-6719
- Grivell, L.A.** (1989)  
Small, beautiful and essential, *Nature* 341: 569-571
- Guo, G, Yan-sanders, Y., Lyn-Cook, B..D.** (2003)  
Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses, *Mo. Cell.Biol.* 23:2367-2378
- Hoek, J.B.;** Cahill, A.; Pastorino, J.G. (2002)  
Alcohol and Mitochondria: A Dysfunctional Relationship, *Gastroenterology* 122: 2049-2063
- Hohoff, C.;** Brinkmann, B.(2003)  
Trends in der forensischen Molekulargenetik, *Rechtsmed.*13: 183-189
- Horai, S.;** Hayasaka, K.(1990)  
Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA, *Am. J. Hum. Genet.* 46:828-842
- Hou, J.H.;** Wei, Y.H. (1996)  
The unusual structures of the hot-regions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA, *Biochem. J.* 318: 1065-1070
- Hsieh, R.-H.;** Hou, J.-H.; Hsu, H.-S.; Wie, Y.-H. (1994)  
Age -dependent respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria, *Biochem. and molecular Biol.Intern.*32: 1009-1022
- Huang, C.-C.;** Chen, R.-S.; Chu, N.-S.; Pang, C.-Y.; Wie, Y.-H. (1996)  
Random mitotic segregation of mitochondrial DNA in MELAS syndrome, *Acto Neurol Scan* 93: 198-202

**Kaldenbach, B.;** (1990)

Mutations of mitochondrial DNA and human death, *Naturwissenschaften* 77: 221-225

**Kaldenbach, B.;** Münscher, C., Frank, V., Müller-Höcker, J.; Napiwotzki, J. (1995)

Human ageing is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA, *Mut. Res.* 338:161-172

**Kiechle, F.L.;** Kaul, K.I.; Farkas, D.H. (1996)

Mitochondrial disorders: Method and specimen selection for diagnostic molecular pathology, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 120: 597-603

**King, M.P.;** Attaradi, G. (1989)

Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation, *Science* 246:500-503

**He, L.;** Chinnery, P.F.; Durham, S.E.; Blakely, E.L.; Wardell, T.M.; Borthwick, G.M.; Taylor, R.W.; Turnbull, D.M. (2002)

Detection and Quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR, *Nucleic Acids Research* 14: e68

**Larsson, N.G.** and Clayton, D.A. (1995)

Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders, *Annu. Rev. Genet.* 29: 151-178

**Larsson, N.G.;** Holme, E.; Krstiansson, B.; Oldfors, A.; Tulinius, M. (1990)

Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kreans-Sayre syndrome, *Pediatr. Res.* 28: 131-136

**Larsson, N.G.;** Eiken, H.G.; Boman, H.; Holme, E.; Oldfors, A.; Tulinius, M. (1992)

Lack of transmission of deleted mtDNA from a woman with Kreans-Sayre syndrome to her child, *Am. J. Hum. Genet.* 50: 360-363

**Lee, H.C.;** Pagliaro, E.M. (1991)

DNA analysis in human bone tissue: RFLP typing, *J. Forensic Sci.* 31: 209-212

**Lee, H.C.;** Pang, C.Y.; Hsu, H.S.; Wei, Y.H. (1994)

Differential accumulation of 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA of various tissues in human ageing, *Biochim. Biophys. Acta* 1226: 37-43

**Lee, H.C.;** Lu, C.Y.; Fahn, H.J.; Wie, Y.H. (1998)

Ageing- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung, *FEBS Lett.* 441: 292-296

**Lewis, W.;** Copeland, W.C.; Day, B.J. (2001)

Mitochondrial DNA Depletion, Oxidative Stress, and Mutation: Mechanism Of Dysfunction from Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors; *Laboratory Investigation* 81: 777-790

**Lim, P.S.;** Ma, Y.S.; Cheng, Y.M.; Chai, H.; Lee, C.F.; Chen, T.L.; Wei, Y.H. (2002)

Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in skeletal muscle of patients with chronic uremia, *J Biomed Sci.* 9 (6 Pt 1): 549-560

**Lianne, A.W.;** Marzuki, S.; Ozawa, T.; Tanaka, M. (1989)

Mitochondrial DNA mutations as a contributor to ageing and degenerative diseases, *The Lancet* 25:642-645

- Löffler, G.;** Petrides, P.E. (1998)  
Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage, Springer
- Mansouri, A.;** Demeilliers, C.; Amsellem, S.; Pessayre, D.; Fromenty, B. (2001)  
Acute Ethanol Administration Oxidatively Damages and Depletes Mitochondrial DNA in Mouse Liver, Brain, Heart and Skeletal Muscles: Protective Effects of Antioxidants, *JPET* 298: 737-743
- Mansouri, A.;** Fromenty, B.; Berson, A.; Robin, M.-A.; Grimbert, S.; Beaugrand, M.; Erlinger, S.; Pessayre, D. (1997)  
Multiple hepatic mitochondrial DNA deletion suggest premature oxidative aging in alcoholic patients, *Journal of Hepatology*; 27:96-102
- Mansouri, A.;** Gaou, I.; de Kerguenec, C.; Amsellem, S.; Haouzi, D.; Berson, A.; Moreau, A.; Feldmann, G.; Lettéron, P.; Pessayre, D.; Fromenty, B. (1999)  
An Alcoholic Binge Caused Massive Degradation of Hepatic Mitochondrial DNA in Mice, *Gastroenterology* 117: 181-190
- Meissner, C.;** von Wurmb, N.; Oemichen, M. (1997)  
Detection of the age-dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA, *Int. Legal. Med.* 110: 288-291
- Meissner, C.;** von Wurmb, N.; Schimansky, B.; Oemichen, M. (1999)  
Estimation of age at death based on quantification of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle, *Forensic Sci Int* 105:115-124
- Meissner, C.;** Mohamed, S.A.; von Wurmb, N.; Oemichen, M. (2001)  
Das mitochondriale Genom und Altern, *Z. Gerontol. Geriat.* 34: 447-451
- Meissner, C.;** Mohamed, S.A.; Klueter, H.; von Wurmb, N.; Oemichen, M. (2000a)  
Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system, *Forensic Sci Int* 113 (1-3):115-124
- Mita, S.;** Rizzuto, R.; Moraes, C.T.; Shanske, S.; Arnaudo, E.; Fabrizi, G.M.; Koga, Y.; diMauro, S.; Schon, E.A. (1990)  
Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large scale deletion of human mitochondrial DNA, *Nucl. Acids Res.* 18: 561-567
- Mohamed, S.A.;** Wesch, D.; Blumenthal, A.; Bruse, P.; Windler, K.; Ernst, M. (2003)  
Detection of the 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells, *Experimental Gerontology*
- Moraes, C.T.;** Sciacco, M.; Ricci, E.; Tengena, C.H.; Hao, H.; Bonilla, E.; Schon, E.A.; DiMauro, S. (1995)  
Phenotype-Genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions, *Muscle & Nerve* 3: 150-153
- Müller-Höcker, J.** (1994)  
Molekularpathologie mitochondrialer Funktionsstörungen, *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 78: 48-93
- Münscher, C.;** Rieger, T.; Müller-Höcker, J.; Kadenbach, B. (1993)  
The point mutation of mtDNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages, *FEBS* 317: 27-30

- Nakase, H.;** Moraes, C.T. Rizzuto, R.; Lombes, A.; DiMauro, S.; Schon, E.A. (1990)  
Transcription and translation of deleted human mitochondrial genomes in Kearns-Sayre syndrome: Implications for pathogenesis, *Am J. Hum. Genet.* 46: 418-427
- Nardelli, M.;** Tommasi, S.; Dérchia, A.M. et al (1994)  
Detection of novel transcripts in the human mitochondrial DNS region coding for ATPase8-ATPase6 subunits, *FEBS Letters* 344:10-14
- Naumann, M.;** Reiners, K.; Gold, R.; schindler,R.; Paulus, W.; Klopstock, T.; Reichmann, H. (1995)  
Mitochondrial dysfunction in adult-onset myopathies with structural abnormalities, *Acta Neuropathol.* 89: 152-157
- Newton, C.R.; Graham, A.** (1997)  
*Labor im Fokus PCR 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford*
- Nishioka, T.;** Soemantri, A.; Ishida, T. (2004)  
mtDNA/nDNA ratio in 14484 LHON mitochondrial mutation carriers, *J. Hum. Genet.* 49: 701-705
- Pfeiffer, H.;** Brinkmann, B. (2000)  
Sequenzanalyse mitochondrialer DNA in der Rechtsmedizin;Möglichkeiten und Grenzen einer neuen Analyseverfahren in der Spurenkunde, *Rechtsmed.*10: 51-55
- Polisecki, E.Y.;** Schreier; L.E.; Ravioli, J.; Corach, D. (2004)  
Common Mitochondrial DNA Deletion Associated With Sudden Natural Death in Adults *J Forensic Sci* 49 (6):1-4
- Poulton, J.;** Deadman, M.E.; Ramacharan, S.; Gardiner, R.M. (1991)  
Germ-line deletions of mtDNA in mitochondrial myopathy, *Am. J. Hum. Genet.* 48:649-653
- Poulton, J.;** O`Rahilly, S.O.; Morten, K.J.; Clark, A. (1995)  
Mitochondrial DNA, diabetes and pancreatic pathology in Kearns-Syre syndrome, *Diabetologia* 38: 868-871
- Rankin, D.R.;** Narveson, S.D.; Birkby, W.H.; Lai, J. (1996)  
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis on DNA from Human Compact Bone, *JFSCA Vol. 41, 1:* 40-46
- Rashba-Step, J.;** Turro, N.J., Cederbaum, A.I. (1993)  
2 ESR studies on the Production of Reactive Oxygen Intermediates by Rat Liver Mikrosomes in the presents of NADPH or NADH *Biochem.Biophys.* 300: 401-408
- Rhee, S.G.** (1999)  
Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger, *Exp.Mol. Med.* 38: 1543-1552
- Richter, C.** (1995)  
Oxidative damage to mitochondrial DNA and it´s relationship to ageing, *Int. J. biochem. Cell. Biol.* 27: 647-653

- Riordan-Eva, P.;** Sanders, M.D.; Govan, G.G.; Sweeney, M.G.; DaCosta, J.; Harding, A.E. (1995)  
The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation, *Brain* 118: 319-337
- Ro, L.S.;** Lai, S.L.; Chen, C.H.; Chen, S.T. (2003)  
Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hospital-based case-control study, *Muscle Nerve* 28 (6): 737-743
- Robin, T.;** Wong, S. (1988)  
Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells, *J Cell Physiol.* 136:507-513
- Röting, A.;** Cormier, V.; Koll, F.; Mize, C.E. Saudubray, J.M.; Veermann, A.; Pearson, H.A. (1991)  
Site-specific deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome, *Genomics* 10: 502-504
- Schon, E.A.;** Rizzuto, R.; Moraes, C.T.; Nakase, H.; Zeviani, M.; DiMauro, S. (1989)  
A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of mitochondrial DNA, *Science* 244:346-349
- Schwarz, E.;** Neupert, W. (1994)  
Mitochondrial protein import: mechanisms, components and energetics, *Biochim. Biophys. Acta* 1187: 270-274
- Setzer, B.;** Schlesier, M.; Walker, U.A. (2005)  
Effects of didanosine-related depletion of mtDNA in human T lymphocytes, *J Infect Dis.* 191 (6): 848-855
- Shigenaga, M.K.;** Hagen, T.M.; Ames, B.N. (1994)  
Oxidative damage in aging, *Proceedings of the National Academy of Science Usa* 91: 10771-10778
- Shao, J.Y.;** Li, Y.H.; Gao, H.Y.; Mai, H.Q.; Zhang, Y.; Guo, X.; Zeng, Y.X. (2004)  
High frequency of Common Deletion (4981 bp) in Mitochondrial DNA in Nasopharyngeal Carcinoma and its Correlation with Patient Age and Clinical Stages, *Cancer Biol Ther.* 14: 3 (12)
- el-Sharnooby, J.A.;** Ahmed, L-M. (2003)  
Potential relationship between peripheral blood mitochondrial DNA content and insulin resistance and secretion in offspring of type2 diabetic patients, *Egypt J Immunol.* 10 (2): 57-66
- Shenkar, R.;** Navidi, W.; Tavare, S.; Dang, M.H.; Chomn, A.; Attardi, G.; Cortopassi, G.A.; Arnheim, N. (1996)  
The mutation rate of humane mtDNA deletion mtDNA 4977, *Am. J.Hum. Genet.* 59: 749-755
- Shih, K.D.;** Yen, T.C.; Pang, C.Y.; Wei, Y.H. (1991)  
Mitochondrial DNA mutation in a chinese family with myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 1109-1116

- Shoubridge, E.A.;** Karpati, G.; Hastings, K.E.M. (1990)  
Deletions mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal muscle fiber segments in mitochondrial disease, *cell*: 43-49
- Simonetti, S.;** Chen, X.; DiMauro, S.; Schon, E.A. (1992)  
Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR, *Biochem. Biophys. Acta* 1180:113-122
- Singer, M.;** Berger, P. (1992)  
Gene und Genome, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Smith, O.P.;** Hann, I.M.; Woodward, C.E.; Brockington, M. (1995)  
Pearson's marrow/pancreas syndrome: haematological features associated with deletion and duplication of mitochondrial DNA, *British J. of Haematology* 90: 469-472
- Sobreira, C.;** Davidson, M.; King, M.K.; Miranda, A.F. (1996)  
Dehydrorhodamine 123 identifies impaired mitochondrial respiratory chain function in cultured cells harboring mitochondrial DNA mutations, *J. Histochem. Cytochem.* 44: 571-579
- Soong, N.W.;** Hinton, D.R.; Cortopassi, G.; Arnheim, N. (1992)  
Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain, *Nature genetics* 2:318-323
- Stoneking, M.;** Hedgecock, D.; Higuchi, R.G.; Vigilant, L.; Ehrlich, H. (1991)  
Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes, *Am. J. Genet.* 48: 370-382
- Stryer, L.** (1991)  
Biochemie, 3. überarbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York
- Szibor, M.;** Holtz, J. (2003)  
Mitochondrial aging, *Basic Res. Cardiol.* 98:210-218
- Taanman, J.-W.** (1998)  
The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, *Biochimica et Biophysica Acta* 1410:103-123
- Tanka-Yamamoto, T.;** Tanka, M.; Ohno, K.; Sato, W.; Horai, S.; Ozawa, T. (1989)  
Specific amplification of deleted mitochondrial DNA from a myopathic patient and analysis of deleted region with S1 nuclease, *Biochim. Biophys. Acta* 1009: 151-155
- Thorsness, P.E.;** Fox, T.D. (1990)  
Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* 346: 376-379
- Tsuchishima, M.;** Tsutsumi, M.; Shiroeda, M.; Yano, H.; Ueshima, Y.; Shimanaka, K.; Takase, S. (2000)  
Study of Mitochondrial DNA Deletion in Alcoholics, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* No.4 24: 12S-15S

- Vawter, L.;** Brown, W.M. (1986)  
Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in The molecular clock, *Science* 234: 194-195
- Vrzoc, M.;** Petras, M. (1996)  
Comparison of DNA damage in peripheral blood and spleen lymphocytes using the single-cell gel assay, *Mutation Research* 379: 263-269
- Wallace, D.C.;**(1986)  
Mitotic segregation of mitochondrial DNA in human cell hybrids and expression of Chloramphenicol resistance, *Somatic Cell. Mol. Genet.* 12:41-49
- Wallace, D.C.;**(1999)  
Mitochondrial disease in man and mouse, *Science* 283:1482-1488
- von Wurmb, N.;** Oemichen, M.; Meissner, C. (1998)  
Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood, *Mutation Research* 422: 247-254
- von von Wurmb, N.;** Simeoni, E.; Matthiesen, M.; Wessel, I.; Oemichen, M. (2003)  
Abstammungsbegutachtung mit der RFLP- und STR- Analyse, Eine vergleichende Studie anhand von 113 Terzett-Fällen, *Rechtsmed.* 13: 82-85
- Wurmb, N.;** Higuchi, R.; Fenech, A.P.; Elfstroem, C.; Meissner, C.; Oemichen, M.; Cortopassi, G.A. (2002)  
Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR, *For. Science Intern.* 126: 34-39
- Yamamoto, H.;** Tanaka, M.; Katayama, M.; Obayashi, T.; Nimura, Y.; Ozawa, T. (1991)  
Significant Existence of Detected Mitochondrial DNA in Cirrhotic Liver Surrounding Hepatic Tumor, *Biochem. and Biophys. Res. Communications* No.2, 182: 913-920
- Yen, T.C.;** Su, J.H.; King, K.L.; Wei, Y.H. (1991)  
Ageing-associated 5 kb Deletion in Human Liver Mitochondrial DNA, *Biochem. and Biophys. Res Communications* 178: 124-131
- Yen, T.C.;** King, K.L.; Lee, H.C.; Yeh, S.H.; Wei, Y.H. (1994)  
Age-dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria, *Free rad. Biol. & Med.* 16: 207-214
- Zeviani, M.;** Morales, C.T.; DiMauro, S.; Nakase, H.; Bonilla, E.; Schon, E.A.; Rowland, L.P. (1988)  
Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome, *Neurology* 38: 1339-1346
- Zeviani, M.;** Bresolin, N.; Gellera, C. et al (1990)  
Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: A new autosomal dominant disease, *Am. J. Hum. Genet.* 47: 904-914
- Zeviani, M.;** Mariotti, C.; Antozzi, C.; matteo Fratta, G.; rustin, P.; Prella, A. (1995)  
Oxphos defects and mitochondrial DNA mutations in Cardiomyopathy, *Muscle & Nerve* 3: 170-174



**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die andere Werke dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich durch Angaben der Quellen, auch der Sekundärliteratur, als Entlehnung entnommen.

Ich habe keinen weiteren Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt, die Dissertation wurde nicht andernorts vorgelegt. Ich habe mich keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Annika Mareike Erttmann

**Danksagung:**

Mein Dank gilt vor allem Frau Professor Dr. von Wurb-Schwark, die mir dieses interessante Thema stellte. Ihre kompetente Beratung und geduldige Anleitung machten diese Arbeit erst möglich.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Kaatsch, der mir ermöglichte, in der von ihm geleiteten Abteilung für Rechtsmedizin diese Arbeit durchzuführen.

Weiter danke ich den Sektionsbereichen der rechtsmedizinischen Abteilung des UK-SH mit Standorten in Kiel und Lübeck für die Unterstützung bei Probenentnahmen und Abservierung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Frau Bachmann und den übrigen Mitarbeitern des Labors, die mich bei meiner Arbeit engagiert unterstützten.

Bedanken möchte ich mich ferner bei meinen Eltern und meiner Großmutter, die mir meine Ausbildung erst ermöglichten.

**Lebenslauf:****Annika Mareike Erttmann**

geb. 07.06.1979 in Kiel

**Eltern:**

Gabriele Maria Erttmann geb. Goll

Dr. med. Johann Michael Erttmann

**Schulbildung:**

1985- 1989	Grundschule Wattenbek
1989- 1998	Gymnasium Kieler Gelehrtenschule
24.06.1998	Allgemeine Hochschulreife

**Ausbildung:**

12/1998	Schwesternhelferin Kiel
03/1999- 09/2002	Studium der Humanmedizin in Hamburg
12.09.2001	Ärztliche Vorprüfung
19.9.2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002- 11/2005	Studium der Humanmedizin in Kiel
24.08.2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.10.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2.11.2005	Erteilung der Approbation

**Wissenschaftliche Arbeit:**

05/2003- 06/2005

Experimentelle Untersuchungen im Institut für Rechtsmedizin zu Kiel zum Thema: Auftreten der 4977 bp Deletion der mitochondrialen DNA in Blut, Milz Knochenmark und Skelettmuskel in Bezug auf das Lebensalter

**Ärztliche Tätigkeit:**

01.01.2006- 31.12.2007

Friedrich- Ebert-Krankenhaus  
Neumünster (comment trunck)

seit 01.01.2008

Weiterbildung zur Fachärztin für  
Allgemeine Chirurgie im Friedrich-  
Ebert-Krankenhaus Neumünster

13.9.2007

Fachkunde Strahlenschutz

5.3.2008

Zusatzbezeichnung Notfallmedizin