

# **Mitochondriale DNA und Hitzeschockproteine als Biomarker für Zellstress**

Einsatzmöglichkeiten in der  
forensischen und klinischen Praxis

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Andrea Preuße-Prange**

geb. Prange

Kiel, 2012

Referent/in: PD Dr. Nicole von Wurmb-Schwark

Koreferent/in: Prof. Dr. Manuela Dittmar

*Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2012*

*Zum Druck genehmigt: 09.05.2012*

gez. \_\_\_\_\_, Dekan

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteine	1
1.1.1	Der Aufbau von Proteinen	1
1.1.2	Die Funktion von Proteinen	2
1.2	Stressproteine (Hitzeschockproteine)	4
1.2.1	Entdeckungen und Grundlagen	4
1.2.2	Die HSP70-Superfamilie	7
1.3	Das Gehirn	9
1.3.1	Aufbau und Funktion	9
1.3.2	Das Kleinhirn	10
1.3.3	Das Großhirn	12
1.4	Die Mitochondrien	14
1.4.1	Aufbau und Funktion	14
1.4.2	Mitochondriale DNA (mtDNA)	15
1.4.3	4977 bp mtDeletion (dmtDNA <sup>4977</sup> )	17
1.5	Forensische Relevanz	18
1.6	Klinische Krankheitsbilder	19
1.6.1	Hypoxie	19
1.6.2	Alkoholerkrankung	20
1.6.3	Schädigung durch thermische Energie	22
1.7	Zielsetzung	26
2	Material	28
2.1	Auswahlkriterien für das Untersuchungsgut	28
2.1.1	Auswahlkriterien für das Gewebe zur Methodenetablierung und für die Formalinstudie	28

2.1.2	Auswahlkriterien für das Untersuchungsmaterial	29
2.2	Gewebe für die Etablierung der Methoden	29
2.3	Gewebe für die Formalinstudie	29
2.4	Untersuchungsmaterial	29
3	Methoden	30
3.1	Probenbearbeitung	30
3.2	Proteinanalysen	30
3.2.1	Extraktion aus frischem Gewebe	30
3.2.2	Extraktion aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe	32
3.2.3	Proteinquantifizierung	33
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.2.5	Coomassie-Färbung	36
3.2.6	Silberfärbung	37
3.2.7	Western Blot und spezifischer Nachweis von Proteinen	38
3.2.8	Immunhistochemischer (IHC) Nachweis von Proteinen	45
3.3	DNA – Analysen	49
3.3.1	DNA Extraktion	49
3.3.2	Realtime (Echtzeit) quantitative PCR (RTq – PCR)	50
3.3	Durchführung der Formalinstudie	53
3.3.1	Studienaufbau und Durchführung	53
3.3.2	Analyse der formalinfixierten Gewebeproben	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Methoden Etablierung	55
4.1.1	Vergleich der Extraktionsmethoden für Frischgewebe	55
4.1.2	Vergleich der Extraktionsmethoden für Formalingewebe	56

4.1.3	Coomassie-Färbungen	57
4.1.4	Silberfärbung	57
4.1.5	Etablierung des Western Blots und spezifischer Nachweis von Proteinen	58
4.2	Einfluss der Formalinfixierung auf die Untersuchungsergebnisse und deren Aussagekraft	60
4.2.1	Proteinanalysen	60
4.2.2	DNA-Analysen	65
4.3	Ergebnisse der forensischen Proben	68
4.3.1	Untersuchung der nukleären DNA (nDNA)	68
4.3.2	Quantifizierung mitochondrialer DNA	72
4.3.3	Quantifizierung der 4977bp Deletion der mtDNA	79
4.3.4	Analyse der Stressproteine HSPA8 und HSPA1A	85
4.3.5	Vergleich des prozentualen Anteils an dmtDNA <sup>4977</sup> und der Konzentration an HSPA8 / HSPA1A unter Berücksichtigung der Todesursache	91
5	Diskussion	106
5.1	Methodenetablierung	106
5.1.1	Extraktionsmethoden	106
5.1.2	SDS-PAGE	106
5.1.3	Coomassie-Färbung	107
5.1.4	Western Blot	107
5.2	Formalinstudie	109
5.2.1	Eigenschaften von Formalin	109
5.2.2	Proteinanalytik	109
5.2.2	DNA-Analysen	111
5.3	Altersabhängigkeit	112
5.3.1	Proteinanalyse	113

5.3.2	DNA-Analyse	115
5.4	Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an dmtDNA <sup>4977</sup> und der Konzentration an HSPA8 / HSPA1A unter Berücksichtigung der Todesursache	117
6	Zusammenfassung	120
7	Summary	122
8	Ausblick	124
9	Anhang	125
9.1	Abkürzungsverzeichnis	125
9.2	Reagenzien und Chemikalien	127
9.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	129
9.4	Puffer und Lösungen für die Proteinanalyse	131
9.4.1	Puffer für die Extraktion	131
9.4.2	Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	132
9.4.3	Coomassie-Färbung	133
9.4.4	Silberfärbung nach Blum et al., 1987 modifiziert von Lerch, 2001	136
9.4.5	Puffer für den Semi-Dry-Blot	137
9.4.6	Amidoschwarzfärbung	137
9.4.7	Immundetektion	138
9.4.8	Puffer für die Immunhistochemie	139
9.5	Temperaturprofile	139
9.5.1	Dehydrierungsprogramm des Shandon, Hypercenter XP (Thermo Scientific)	139
9.5.2	PCR Programm RT-qPCR nDNA	140
9.5.3	PCR Programm RT-qPCR mtDNA	140
9.6	PCR Reaktionsansätze	140
9.6.1	Reaktionsansatz für nukleäre DNA für eine Probe (2 µl DNA Einsatz)	140

9.6.2	Reaktionsansatz für mtDNA und dmtDNA <sup>4977</sup> für eine Probe (2 µl DNA Einsatz)	141
9.7	Tabellen	142
9.7.1	Daten der Pilotstudie	142
9.7.2	Daten der Formalinstudie	200
10	Literaturverzeichnis	216
11	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	235
11.1	Tabellenverzeichnis	235
11.2	Abbildungsverzeichnis	237
12	Danksagung	240
13	Lebenslauf	241
14	Selbstständigkeitserklärung	242

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteine

### 1.1.1 Der Aufbau von Proteinen

Proteine sind aus Aminosäuren (AS) aufgebaut. Diese sind über Amidbindungen zu Ketten unterschiedlicher Länge verknüpft. Diese Amidbindung wird auch als Peptidbindung bezeichnet. Polymere, die aus zwei-, drei-, einigen (3-10) oder vielen Aminosäuren zusammengesetzt sind, werden entsprechend als **Di-, Tri-, Oligo- und Polypeptide** charakterisiert. Nachdem die einzelnen Aminosäuren in ein Peptid eingebaut wurden, werden sie Aminosäurereste genannt. Da Polypeptide lineare Polymere sind, ist jede Aminosäure an zwei Peptidbindungen beteiligt (Voet et al., 2010). Aminosäuren zeichnen sich durch eine Aminogruppe ( $-NH^2$ ) und eine Carboxylgruppe ( $-COOH$ ) aus. Diese beiden Gruppen sowie ein Wasserstoffatom und eine je nach Aminosäure unterschiedliche Seitenkette sind um ein zentrales Kohlenstoffatom  $C_2$  gruppiert. Dies wird aufgrund der unmittelbaren Nähe zur Carboxylgruppe auch als  $-C$ -Atom bezeichnet. Der Dissoziationsgrad der Aminosäure ist abhängig vom pH-Wert der Lösung. In den Proteinen sind nur die endständigen Carboxyl- bzw. Aminogruppen polarisierbar.

Bei der Proteinbiosynthese werden 20 Standardamino­säuren in die Peptidkette eingebaut (Munk et al., 2008). Diese 20 Standardamino­säuren werden nach der Polarität ihrer Seitenketten wie folgt eingeteilt:

- Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten (z.B. Glycin und Alanin)
- Aminosäuren mit geladenen polaren Seitenketten (z.B. Lysin und Histidin)
- Aminosäuren mit ungeladenen aber polaren Seitenketten (z.B. Serin und Tyrosin)

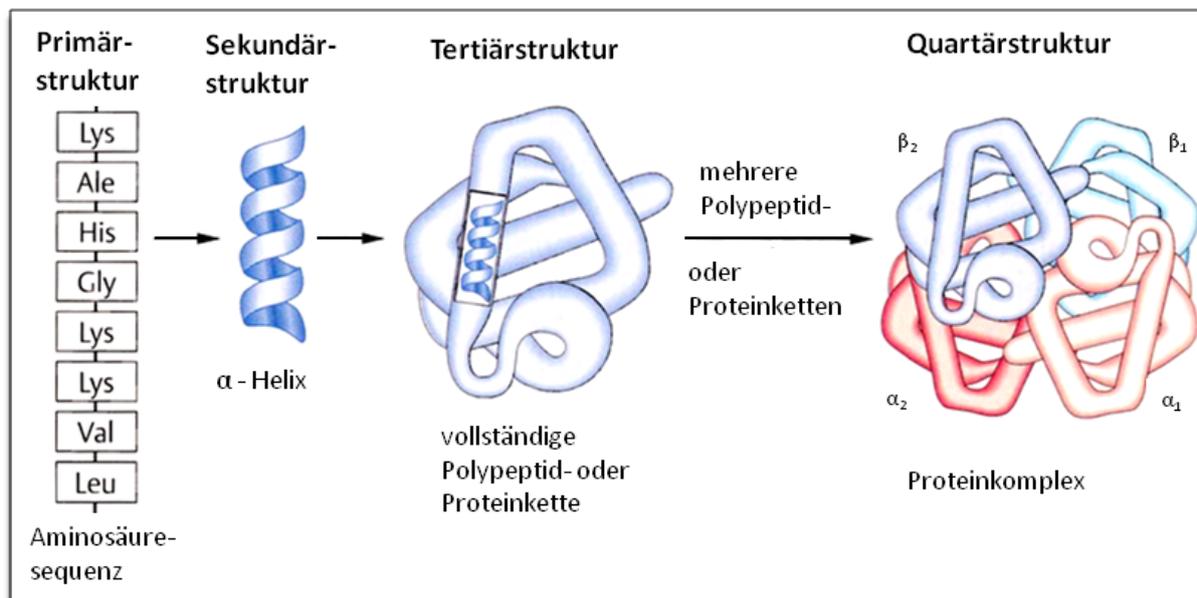
Die jeweiligen Eigenschaften der Seitenketten bestimmen die räumliche Struktur und Funktion des fertigen Proteins (Voet et al., 2010). Dabei liegen Proteine nicht als lineare Polypeptidketten vor, sondern bilden komplexe dreidimensionale Strukturen.

Die Faltung eines Proteins wird durch die Verteilung von polaren und unpolaren Seitenketten beeinflusst. Jedes Protein faltet sich in eine ganz spezielle dreidimensionale Struktur. Die endgültige Konformation einer Polypeptidkette ist meist diejenige mit der geringsten freien Energie. Diese kann sich geringfügig ändern, wenn das Protein mit einem

## Einleitung

anderen Molekül in der Zelle in Wechselwirkung tritt. Für die Funktion des Proteins ist diese Konformationsänderung oft von großer Bedeutung. In der lebenden Zelle wird diese Proteinfaltung durch spezielle Proteine die molekularen Chaperone, unterstützt. Proteine besitzen vier Organisationsstufen. Die **Primärstruktur** ist die Aminosäuresequenz des Proteins. Als **Sekundärstruktur** werden Abschnitte der Polypeptidkette benannt, die  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter bilden. Die dreidimensionale Anordnung der Polypeptidketten im Raum wird als **Tertiärstruktur** bezeichnet. Ein Protein, das aus mehr als einer Polypeptidkette besteht, wird als **Quartärstruktur** deklariert (Abb. 1).

Einzelne Proteine können sich zu großen effizienten Aggregaten verknüpfen. Diese führen viele der wichtigsten Reaktionen in der Zelle aus (Alberts et al., 2004).



**Abbildung 1: Darstellung der Proteinstrukturen am Beispiel des Hämoglobins.** Die Aminosäuresequenz entspricht der Primärstruktur eines Proteins. Die  $\alpha$ -Helix ist eine mögliche Sekundärstruktur dar. Die  $\alpha$ -Helix ist auch Teil der Tertiärstruktur der  $\alpha$ -Polypeptidkette. Die höchste Strukturebene stellt die Quartärstruktur dar, die die räumliche Anordnung der Untereinheiten im Hämoglobin wiedergibt (modifizierte Darstellung, aus (Munk et al., 2008)).

### 1.1.2 Die Funktion von Proteinen

Proteine sind die häufigsten Makromoleküle in lebenden Organismen und an allen lebenswichtigen Funktionen beteiligt. Als Strukturproteine sind sie verantwortlich für die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen und sorgen für mechanische Stabilität wie z. B. die Laminaproteine im Zellkern oder die Proteine des Cytoskeletts. Das extrazelluläre

## Einleitung

Kollagen ist verantwortlich für die Form des Bindegewebes. Eine der vielfältigsten Proteingruppen sind die **Enzyme**. Mehrere Tausend verschiedene Enzyme katalysieren die unterschiedlichsten biochemischen Prozesse innerhalb der Zelle. Viele Enzyme werden durch **Regulatorische Proteine** beeinflusst. Die Expression von Genen wie z.B. der Lambda-Repressor werden über Regulatorproteine gesteuert. Proteine sind so an der Regulation der Entwicklung, Differenzierung und am Wachstum von Zellen bzw. ganzer Organismen beteiligt. Bei Bewegungen spielen Proteine ebenfalls eine entscheidende Rolle sowohl auf zellulärer als auch auf der Ebene des Gesamtorganismus. Das **Motorprotein** Myosin wirkt, zusammen mit anderen Proteinen nicht nur an vielfältigen intrazellulären Bewegungen, sondern auch an der Muskelkontraktion mit. Hämoglobin versorgt als Transportprotein den Körper mit Sauerstoff und sorgt darüber hinaus für den Abtransport des Kohlenstoffdioxids. Membranintegrale **Transportproteine** vermitteln den Transport von Ionen oder Molekülen durch die sonst nicht durchlässigen zellulären Membranen. So sind sie z.B. verantwortlich für den Ionenhaushalt der Zelle sowie für die Übertragung und Weiterleitung von Impulsen entlang von Nervenzellen. Andere membranintegrale Proteine wirken auf Oberflächen der Zellen als Rezeptoren für Signale und Botenstoffe und veranlassen die entsprechenden Reaktionen im Zellinneren. Diese Botenstoffe (**Hormone**) können wiederum auch Proteine sein, wie das Insulin. Spezielle Proteine, die **Immunglobuline**, werden im Verlauf einer Abwehrreaktion durch das Immunsystem gebildet. Diese hochspezifischen Antikörper binden sich an Antigene. Diese organismusfremden, möglicherweise krankheitserregenden Strukturen (Antigene) können ebenfalls Proteine sein. Auch die **Ribosomen**, an denen die Proteinbiosynthese stattfindet, bestehen neben RNA zu einem großen Teil aus einzelnen Polypeptiden und Proteinen. Proteine sind auch an der DNA-Replikation, Transkription und in Form des Spindelapparates auch an der Zellteilung beteiligt. Als Proteasomen sind Proteine auch mit ihrem Abbau betraut (Munk et al., 2008).

Außerdem gibt es Proteine, die ein oder mehrere Metallionen enthalten ohne katalytisch wirksam sein zu müssen. Zu dieser Gruppe der Metalloproteine gehört z.B. das **Metallothionin**. Dabei handelt es sich um cytoplasmatische Proteine die unter physiologischen Bedingungen an Zink und Kupfer, aber auch an Schwermetalle wie z.B. Cadmium (Kägi et al., 1988) binden. Durch Bindung von Cadmium an die Metallothionine entsteht ein Cadmium-Metallothionin-Komplex (CdMT) (Shaiks et al., 1972, Shaikh et al., 1976, Shaikh et al., 1977, Webb et al., 1982). Im Laufe der Zeit wird dieser Komplex aus der

Leber in die Nieren (Dudley et al., 1985, Chan et al., 1993) transportiert. Der CdMT-Komplex wird gefiltert (Cherian et al., 1975, Foulkes 1978) und durch lysosomale Enzyme abgebaut (Squibb et al., 1979). So wird der Körper vor einer Intoxikation geschützt.

## 1.2 Stressproteine (Hitzeschockproteine)

### 1.2.1 Entdeckungen und Grundlagen

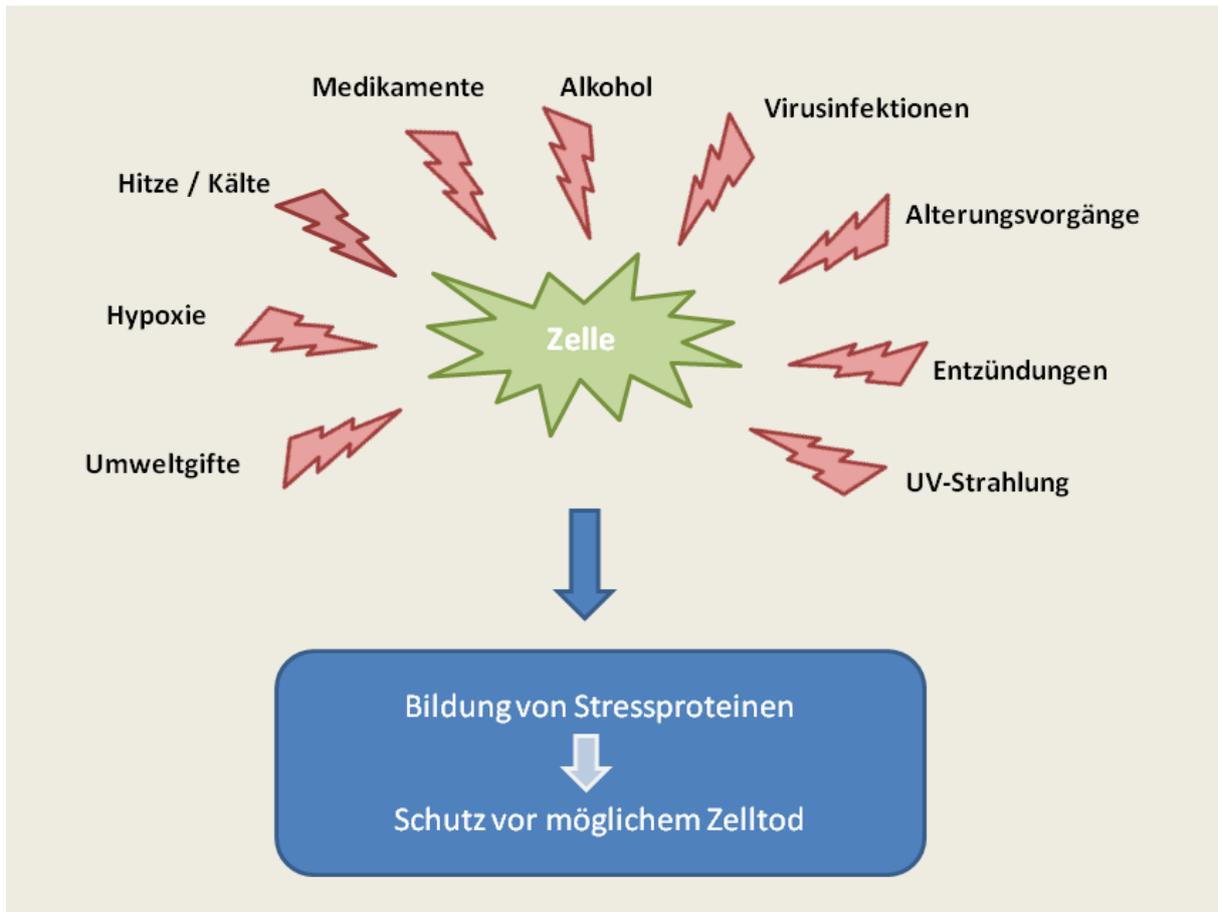
Hitzeschockproteine (Hsp = heat shock protein) wurden das erste Mal von Ritossa et al., 1962 beschrieben. Bei Temperaturversuchen mit der Taufliege *Drosophila melanogaster* konnten sie nachweisen, dass die Fliegen nach Erhöhung der Temperatur ein anderes Puffing-Muster der Polytänochrosomen aufwiesen als vorher.

Tissières et al., konnten 1974 zeigen, dass gleichzeitig mit diesen Puffs eine bestimmte Gruppe von Proteinen in großer Zahl exprimiert wurde. Der Hitzestress führte in den Zellen zu einer erhöhten Synthese bestimmter Proteine, die zuvor nur in geringen Mengen vorkamen.

Zellen, die einem mäßigen Hitzestress ausgesetzt waren, sind außerdem gegenüber einer starken Temperaturerhöhung, aber auch gegenüber anderen Stressoren resistenter und zeigen eine höhere Überlebensrate als unbehandelte Zellen (Feige et al., 1994). Dieses Phänomen wird als erworbene Thermotoleranz bezeichnet (Georgopolous et al., 1993). Folglich wurden diese neu entdeckten Proteine aufgrund ihrer Induzierbarkeit durch Hitze als Hitzeschockproteine bezeichnet (Tissières et al., 1974).

Weitere Versuche zeigten, dass auch andere Stressoren als Hitze die Stressantwort auslösen können. Es sind bereits mehr als 100 chemische und biologische Stressoren bekannt. Dabei wird unterschieden, ob die Stoffe nur in bestimmten Organismen oder Organen eine Stressantwort auslösen oder ob sie generell in allen Organismen und Organen eine Hochregulierung der Proteinsynthese hervorrufen (Nover 1990, Teil 1). Zu den Stressoren zählen neben Hitze und Kälte auch Sauerstoffmangel, UV-Strahlung (Richter-Landsberg et al., 2006), Schwermetalle und Alkohole (Nover 1990, Teil 1). Da die Stressantwort nicht nur durch Hitze ausgelöst wird, werden die Hitzeschockproteine heute als **Stressproteine** bezeichnet (Abb. 2).

## Einleitung



**Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher Auslöser der zellulären Stressantwort (eigene Illustration).** Stressoren und biologische Signale wirken auf die Zelle ein und führen zur vermehrten Produktion von Stressproteinen. Diese schützen die Zelle vor einer möglichen Apoptose.

Neben den durch Stress induzierten Proteinen existieren auch Stressproteine, die konstitutiv exprimiert werden, sie werden als Heat-Shock-Cognates (HSC) bezeichnet (Becker et al., 1994). Diese Proteine, wie z. B. das HSPA8 (Hsc70) erfüllen unter physiologischen Bedingungen ihre Aufgabe als Chaperone bei der Faltung und dem Transport von neu synthetisierten Proteinen (Burel et al., 1992). Diese konstitutiv vorkommenden Stressproteine werden unter Stressbedingungen oder in bestimmten Zellzyklusphasen ebenfalls vermehrt synthetisiert (Lindquist 1986, Lindquist et al., 1988). Sowohl prokaryotische (McAlister et al., 1979) als auch eukaryotische (Ashburner 1970, McKENZIE et al., 1975) Zellen enthalten verschiedene Chaperon-Systeme. Eukaryotische Zellen verfügen über Chaperon-Systeme in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle wie z. B. im Cytosol (Young 2004), im Endoplasmatischen Retikulum (Kleizen et al., 2004) und den Mitochondrien (Voos et al., 2002). Die Chloroplasten der Pflanzenzellen verfügen ebenfalls über ein eigenes Chaperon-System (Becker 2005), das wie das der Mitochondrien mehr denen von

## Einleitung

Eubakterien ähnelt als dem des Cytosols eukaryotischer Zellen. Der Anteil der Stressproteine am Gesamtprotein der Zelle liegt bei bis zu 5 % (Feige et al., 1994) und kann unter Stressbedingungen auf bis zu 15 % ansteigen (Lindquist et al., 1988, Welch 1993).

Früher wurden die Stressproteine nach ihrer Molekulargröße in Familien eingeteilt. Im Laufe der Zeit wurden ständig weitere Genprodukte entdeckt, die den verschiedenen Familien zugeordnet werden mussten. Da es für die Benennung kein einheitliches System gab, wurde die Nomenklatur extrem unübersichtlich. Für einige Proteine wurden bis zu zehn verschiedene Namen vergeben. Tavaría et al., unternahm 1996 den ersten Versuch einer neuen Nomenklatur. 2009 veröffentlichten (Kampinga et al., 2009) eine neue Nomenklatur und dazugehörige Richtlinien zur Benennung der **humanen HSP - Familien** und der einzelnen Stressproteine.

Im Folgenden wird auf die HSPA – Familie, ein Mitglied der HSP70 – Superfamilie, näher eingegangen. In Tabelle 1 sind zwei Vertreter der HSP70 – Superfamilie aufgeführt.

**Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Stressproteine.**

HSP - Familie	Mitglied (neue Nomenklatur)	Alte Nomenklatur	Lokalisation	Funktion
<b>HSPA (früher HSP70)</b>	HSPA1A (induzierte Form)	HSP72	Cytosol / Nucleus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aggregationsverhinderung von Hitze denaturierten Proteinen</li> <li>- Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit Vertretern der HSPH - Familie</li> <li>- Regulation der Hitzeschockantwort</li> <li>- Antiapoptotisch</li> </ul>
<b>HSPA (früher HSP70)</b>	HSPA8 (konstitutive Form)	HSP73	Cytosol / Nucleus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faltung neu synthetisierter Proteine</li> <li>- Aggregationsverhinderung von Hitze denaturierten Proteinen</li> <li>- Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit Vertretern HSPH - Familie - Regulation der Hitzeschockantwort</li> <li>- Antiapoptotisch</li> </ul>

### 1.2.2 Die HSP70-Superfamilie

Zur HSP70-Superfamilie gehören die HSPA-Familie (früher HSP70) und die HSPH-Familie (früher HSP110). Die Anzahl der Gene, die die verschiedenen Proteine codieren, sind von Organismus zu Organismus unterschiedlich. So codieren 17 Gene und zahlreiche Pseudogene auf 18 verschiedenen Chromosomen die Mitglieder der HSPA-Familie beim Menschen und dagegen nur drei bei *Escherichia coli*. Die drei Proteine HSPA1A, HSPA1B und HSPA6 sind dabei die Stressproteine mit der höchsten Hitze-Induzierbarkeit (Brocchieri et al., 2008).

Die Bildung von Stressproteinen und deren Funktion sind eng gekoppelt mit dem Überleben der Zelle; speziell die Mitglieder der HSPA-Familie spielen hier eine entscheidende Rolle (Landry et al., 1982, Li et al., 1982, Johnston et al., 1988, Riabowol et al., 1988). Charakteristisch für die HSPA-Familie ist unter physiologischen Bedingungen ihre Chaperonfunktion. HSPA1A ist das am stärksten während der Evolution konservierte Protein, es kommt in allen Organismen vor und ist mit dem prokaryotischen Vertreter (Dnak) auf Aminosäureebene zu 50 % identisch (Lindquist et al., 1988, Hunt et al., 1985, Gupta et al., 1994). Die Konservierung der Proteinsequenzen spiegelt die ebenfalls konservierten funktionalen Eigenschaften zwischen den verschiedenen Spezies wieder (Borchiellini et al., 1998). So schützt das von *Drosophila* kommende, spezifische Hsp70-Protein, wenn es in einer Säugetierzelle exprimiert wird, diese ebenfalls vor Hitzestress (Pelham 1984). Ein Mitglied der humanen HSPA-Familie würde das HSP70-Protein einer Nagetierzelle funktional ergänzen, so dass sie vor verschiedensten Stressoren geschützt ist (Li et al., 1991, Li et al., 1992, Jäättelä et al., 1992).

Bei den bekannten HSP70-Proteinen, auch den Mitglieder der humanen HSPA-Familie, handelt es sich um evolutionär sehr stark konservierte Proteine, welche alle die folgenden Domän-Stukturen aufweisen:

- eine konservierte ATPase-Domäne
  - eine Mittelregion mit Protease sensitiven Seiten
  - eine Peptid Binde-Domäne
  - eine G/P reiche C-Terminale Region (die ein EEVD-Motiv enthält), die Co Chaperone und andere HSPs binden kann
- (Hartl 1996, Tavaría et al., 1996, Bukau et al., 2006).

## Einleitung

Diese konservierten Domän-Strukturen festigen die Chaperonfunktion der HSPA-Proteine und ermöglichen die Bindung von hydrophoben Aminosäuren, die von unkorrekt gefalteten Peptiden exprimiert werden (Hartl 1996, Bukau et al., 2006).

Proteine der HSPA-Familie, die in einem Zellkompartiment lokalisiert sind, haben an ihrem N-terminalen Ende ein Lokalisationssignal, welches sie daran hindert das Kompartiment zu verlassen. HSPA5 ist ein Stressprotein, welches im Endoplasmatischen Retikulum vorkommt. Dieses Protein besitzt ein Rückhaltesignal am C-Terminalen Ende, das verhindert das HSPA5 das Endoplasmatischen Retikulum verlässt (Munro et al., 1987).

Es wird ferner vermutet, dass die Mitglieder der HSPA-Familie auch beteiligt sind am Alterungsprozeß und bei der Krebs induzierten Apoptose (Macario et al., 2005, Lee et al., 2006, Macario et al., 2007, Singh et al., 2007).

### **1.2.2.1 Das Protein HSPA1A (Hsp72)**

**HSPA1A** früher als **HSP72** bezeichnet, ist das wichtigste stressinduzierte Mitglied der HSPA-Familie. Von HSPA1B unterscheidet sich das Protein nur in zwei Aminosäuren, codiert werden die beiden Proteine durch zwei naheverwandte, intronfreie und stressinduzierte Gene auf Chromosom sechs (Wu et al., 1985, Milner et al., 1990).

Unter physiologischen Bedingungen wird HSPA1A in geringen Mengen z. B. in Zellen des Brustgewebes (Torroneguy et al., 2006) und der Epidermis als Schutz vor ultravioletter Strahlung (Jonak et al., 2009) gebildet. Während der G1- und S-Phase des Zellzyklus wird es ebenfalls verstärkt synthetisiert (Milarski et al., 1986, Taira et al., 1997). Ferner ist HSPA1A in der Lage, die lysosomale Stabilität der Zelle zu fördern (Kirkegaard et al., 2010).

Da die unter physiologischen Bedingungen gebildeten Mengen an HSPA1A noch sehr gering sind, kann die vermehrte Bildung von HSPA1A unter Stressbedingungen als Indikator für Zellstress fungieren (Calderwood et al., 2008, Schmitt et al., 2007).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass HSPA1A sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch in einer Stresssituation für die Zelle als Chaperon fungiert und die Ansammlung von Proteinaggregaten verhindert. So wirkt HSPA1A dem Zelltod entgegen (Nollen et al., 1999, Mosser et al., 2000).

### 1.2.2.2 Das Protein HSPA8 (Hsp73)

**HSPA8** wurde früher als **HSP73** oder HSC70 bezeichnet (Kampinga et al., 2009). Die Gen-Sequenz ist auf Chromosom elf lokalisiert und zu 86 % identisch mit der von HSPA1A. HSPA8 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert (Dworniczak et al., 1987) und erfüllt zahlreiche Housekeeping-Chaperon-Funktionen. Zu diesen Funktionen gehören:

- Faltung neu synthetisierter Polypeptide
- Proteintranslokation durch Membranen
- Chaperon vermittelte Autophagozytose
- Abbau von Clatherin ummantelten Vesikeln

Unter physiologischen Bedingungen erfüllt HSPA8 seine zahlreichen Chaperon – Funktionen und unter Stressbedingungen verhindert es die Aggregation von Proteinen (Lindquist et al., 1988, Bukau et al., 2006).

Sowohl HSPA1A als auch HSPA8 kommen typischer Weise im Cytoplasma der Zelle vor. Unter Stress kommt es zu einer Umverteilung der HSPs im Intrazellularraum. Vor allem bei HSPA1A und HSPA8 kommt dabei es zu einer Translokation in den Nucleus, genauer gesagt in der Nucleolus (Nover 1990 (Teil 2), Welch et al., 1984).

## 1.3 Das Gehirn

### 1.3.1 Aufbau und Funktion

Das Gehirn (**Encephalon**) gehört wie das Rückenmark zum **Zentralnervensystem** (ZNS) (Schiebler et al., 1987). Das ZNS ist sowohl für die Reizverarbeitung als auch für die Reizweiterleitung verantwortlich. Dabei steht im Rückenmark die Reizweiterleitung und im Gehirn die Reizverarbeitung im Vordergrund. Mit einem Gewicht von 1,3 bis 1,5 kg (geschlechtsabhängig) ist das Gehirn nach der Leber das schwerste innere Organ des Körpers (Schwegler et al., 2011).

## Einleitung

Das Gehirn lässt sich aufgrund morphologischer und funktioneller Aspekte in folgende Abschnitte gliedern:

- Medulla oblongata (verlängertes Mark)
- Pons (Brücke)
- Mesencephalon (Mittelhirn)
- Diencephalon (Zwischenhirn)
- Cerebellum (Kleinhirn)
- Telencephalon (Groß- oder Endhirn)

Der Hirnstamm setzt sich aus Medulla oblongata, Pons und Mesencephalon zusammen.

Medulla oblongata, Pons und Cerebellum werden auch als Rhombencephalon (Rautenhirn) zusammengefasst. Als Metencephalon (Hinterhirn) wird der Pons (Brücke) zusammen mit dem Cerebellum (Kleinhirn) bezeichnet (Trepel 2008).

### 1.3.2 Das Kleinhirn

#### 1.3.2.1 Anatomie

Das Kleinhirn (**Cerebellum**) befindet sich in der hinteren Schädelgrube und sitzt der Medulla oblongata und dem Pons von dorsal auf. Es wiegt etwa 130 – 140 g (Faller et al., 1995). Vom Großhirn wird es durch das Tentorium cerebelli getrennt. Mit dem Hirnstamm ist das Kleinhirn durch drei Kleinhirnstiele verbunden. Entwicklungsgeschichtlich lässt sich das Kleinhirn in Archicerebellum (Urkleinhirn), Paleocerebellum (Altkleinhirn) und Neocerebellum (Neukleinhirn, phylogenetisch am jüngsten) einteilen (Trepel 2008). Zu den alten Bereichen des Cerebellums zählen der Vermis (Wurm) und Flocculus (Kleinhirnflocke) und das vordere Viertel beider Hemisphären bis hin zu der tiefen Hauptfurche. Die hinteren Abschnitte der Hemisphären sind neueren Ursprungs (Abb. 3).

Im Längsschnitt durch das Kleinhirn ist erkennbar, dass die Rinde kaum einen Millimeter dick und vielfach aufgeworfen und in Falten gelegt ist. Tief im Inneren der weißen Substanz liegen Gruppen von Nervenzellkörpern, die Kleinhirnkerne. Der auffälligste ist der Nucleus dentatus („gezahnter Kern“). Die graue Substanz der Kleinhirnrinde faltet sich an der Oberfläche auf, um möglichst viele Nervenzellen mit ihren Dendriten und Axonen auf wenig Platz unterzubringen (Schwegler et al., 2011).

### 1.3.2.2 Funktion

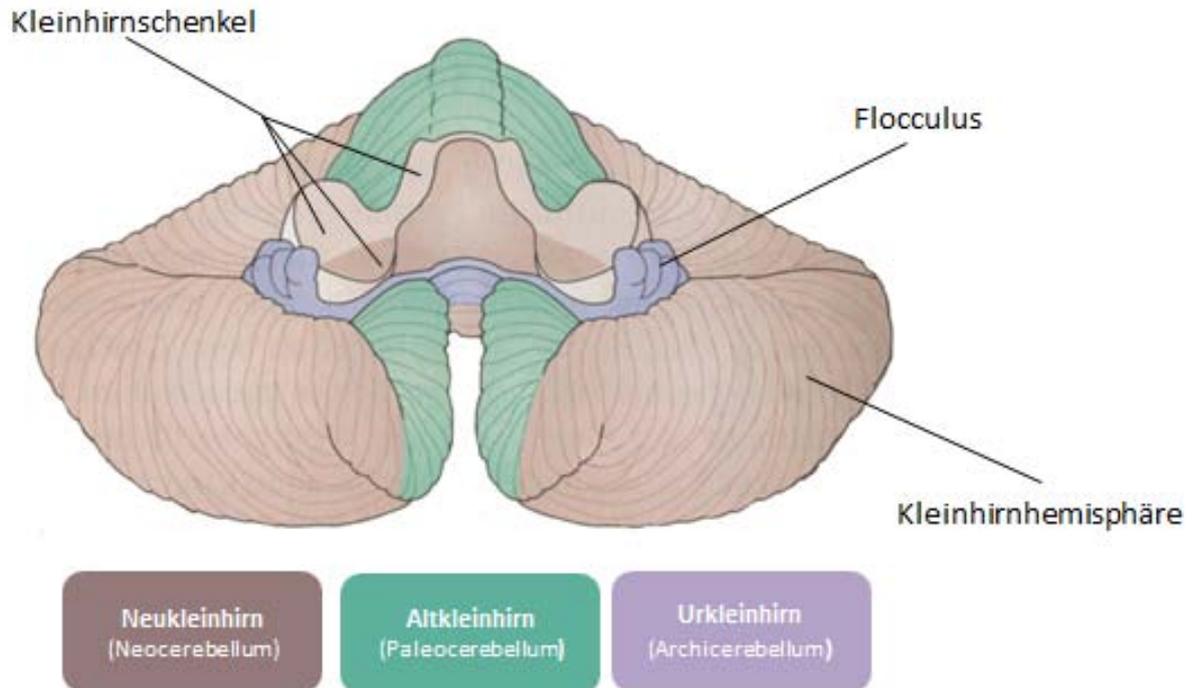
Das Kleinhirn ist ein Regulationsorgan für die Motorik. Es hält in Abstimmung mit dem Labyrinthorgan das Körpergleichgewicht aufrecht und koordiniert den Muskeltonus sowie die zeitliche Abfolge der Bewegungen, ohne sie jedoch auszulösen (Schiebler et al., 1987).

Das Cerebellum lässt sich funktionell in drei Bereiche gliedern:

1. Das Vestibulocerebellum: - Feinabstimmung aller Augenbewegungen  
- Indirekte Einflussnahme auf die Stützmotorik des Rumpfes  
- Unterdrückung des vestibulookulären Reflexes
2. Das Spinocerebellum: - Einfluss auf die Impulse des Muskeltonus und Bewegung der proximalen Extremitätenmuskeln  
- Einfluss auf die Stützmotorik
3. Das Pontocerebellum: - Erlernen und Feinabstimmung beim von willkürlichen Zielbewegungen

Neben den motorischen Funktionen hat das Kleinhirn auch Einfluss auf das vegetative Nervensystem. Außerdem ist es an kognitiven und emotionalen Funktionen (Orientierungsfähigkeit, Kurzzeitgedächtnis und Konditionierungsvorgänge) beteiligt (Trepel 2008).

## Einleitung



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kleinhirns nach Duus.** Ansicht von unten, die Kleinhirnschenkel sind durchtrennt (Faller et al., 1995).

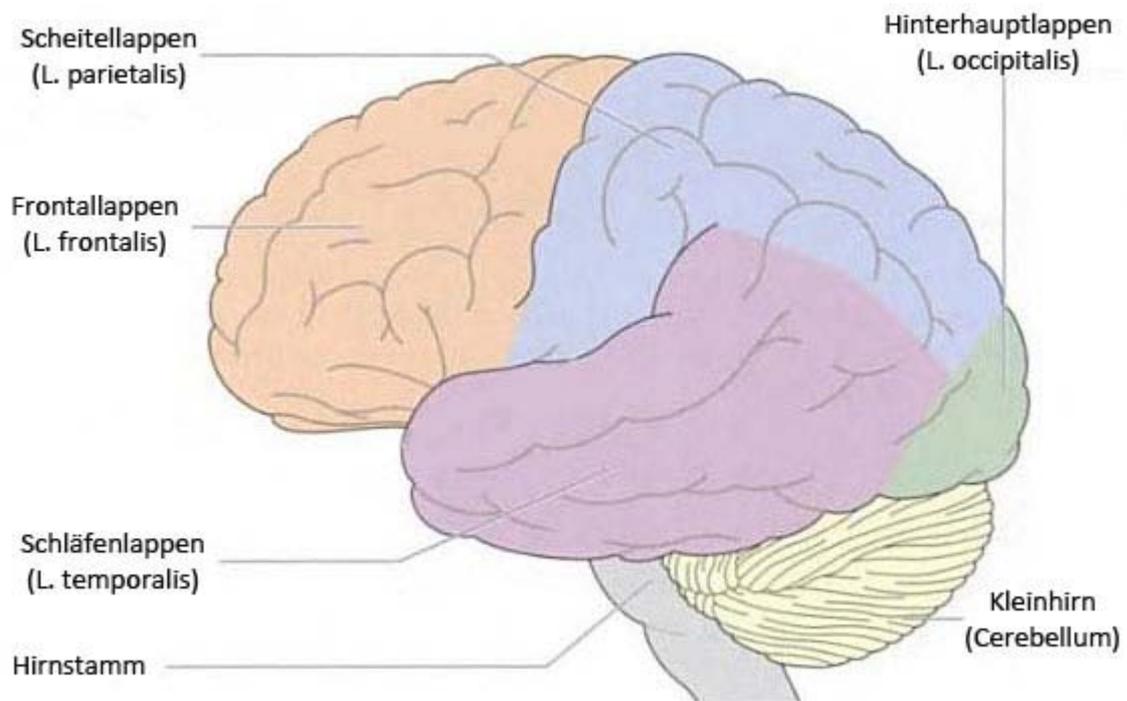
### 1.3.3 Das Großhirn

#### 1.3.3.1 Anatomie

Als größter Teil des Gehirns liegt das Großhirn (**Telencephalon**) der knöchernen vorderen und mittleren Schädelgrube auf und setzt sich aus zwei Hauptkomponenten zusammen: den beiden Großhirnhemisphären (linke und rechte) und mehreren paarigen grauen Kernen, den Basalganglien. Jede Großhirnhemisphäre gliedert sich wiederum in vier Lappen (Abb. 4):

- Hinterhauptlappen (Lobus occipitalis)
- Scheitellappen (Lobus parietalis)
- Schläfenlappen (Lobus temporalis)
- Stirnlappen (Lobus frontalis)

## Einleitung



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lappengliederung des Großhirns.** Ansicht von links nach Frick (Faller et al., 1995).

Bei minimalem Raumverbrauch und maximaler Oberflächenvergrößerung ist das Großhirn des Menschen stark gefaltet, wodurch Furchen und Windungen entstehen (Faller et al., 1995, Trepel 2008). Zwei große Furchen trennen den Scheitellappen einerseits vom Schläfenlappen (Sulcus lateralis) und andererseits vom Stirnlappen (Sulcus centralis) (Schwegler et al., 2011). Es wird zwischen Primär-, Sekundär- und Tertiärfurchen unterschieden. Die zuerst auftretenden Primärfurchen sind bei allen Menschen gleich, während die Sekundärfurchen bei vielen Menschen variabel und die Tertiärfurchen bei jedem Individuum unterschiedlich sind.

Auch im Telencephalon lassen sich graue und weiße Substanz voneinander unterscheiden. Im frontalen Schnitt zeichnen sich die Großhirnhemisphären durch eine zwei bis fünf Millimeter dicke graue Rindenschicht (cortex cerebri) aus, die vorwiegend Zellkörper enthält und einer inneren, weißen Markschicht, die aus Nervenfasern besteht (Schwegler et al., 2011).

### **1.3.3.2 Funktion**

Im Großhirn sind die Hirnfunktionen wie das Denken, das Sprechen, das Bewusstsein und das Gedächtnis lokalisiert. Die vordere Zentralwindung des Stirnlappens ist Sitz des motorischen Zentrums, das Impulse zu den willkürlich innervierten Muskeln sendet. Der am weitesten stirnwärts gelegene Punkt der Stirnpol (Frontalpol), ist der Sitz der Persönlichkeit. Die Basalganglien haben eine wichtige Funktion innerhalb des extrapyramidal-motorischen Systems. Sie übernehmen Teilaufgaben der motorischen Aktivität im Besonderen die Einleitung und Durchführung langsamer Bewegungen (Faller et al., 1995, Schwegler et al., 2011).

## **1.4 Die Mitochondrien**

### **1.4.1 Aufbau und Funktion**

In den Eukaryotenzellen erfolgen die Zellatmung und die oxidative Phosphorylierung in membranumschlossenen Organellen den Mitochondrien (Madigan et al., 2002).

Diese Organellen sind 2 - 5  $\mu\text{m}$  lang und haben einen Durchmesser von 0,5 – 1  $\mu\text{m}$ . Sie können stäbchen- bis fast kugelförmig sein.

Eine typisch tierische Zelle kann bis zu 1000 Mitochondrien enthalten. Ihre Anzahl pro Zelle hängt jedoch von Zelltyp und Zellgröße ab (Madigan et al., 2002). Die mitochondriale Membran ist ähnlich konstruiert, wie andere Einheitsmembranen und besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden, in die Proteine eingebettet sind. Im Gegensatz zur Cytoplasmamembran ist jedoch die äußere Mitochondrienmembran recht durchlässig. Sie enthält viele Kanäle durch die Ionen und kleine organische Moleküle hindurchtreten können. Aus diesem Grund kann das Adenosin-Triphosphat (ATP), das im Mitochondrion produziert wird, ins Cytoplasma gelangen, wo es in energieverbrauchenden Reaktionen genutzt wird (Madigan et al., 2002).

Mit Hilfe von Sauerstoff wird an den mitochondrialen Doppelmembranen hergestellt. ATP ist der wichtigste Energielieferant bei nicht Photosynthese betreibenden Zellen. Die meisten intrazellulären Stoffwechselforgänge sind direkt oder indirekt ATP-abhängig. Die Endosymbiontentheorie besagt, dass sich Mitochondrien aus eigenständigen Prokaryoten entwickelt haben. Im Verlauf der Evolution sind diese Prokaryoten eine Endosymbiose mit

einer eukaryotischen Zelle eingegangen, das heißt sie leben in ihrer Wirtszelle zum gegenseitigen Vorteil. Als Beweis dafür dienen u. a. der Aufbau der Mitochondrien mit ihrer Doppelmembran und die Tatsache, dass Mitochondrien ihre eigene DNA und Proteinbiosynthese besitzen. Deswegen werden sie als semiautonome Organellen bezeichnet. Die Anzahl an Mitochondrien verdoppelt sich mit jedem Zellzyklus durch Zweiteilung. Die Mitochondrien benötigen zur mtDNA-Duplikation und zur Proteinbiosynthese zellkernkodierte Proteine, die über Transportproteine in die Mitochondrien gelangen (Alberts et al., 2004).

### **1.4.2 Mitochondriale DNA (mtDNA)**

Die humane, mitochondriale DNA (mtDNA) ist meist doppelsträngig und zirkulär aufgebaut (siehe Abb. 5). Sie ist an die innere Membran der Mitochondrien gebunden. Die mtDNA wird fast ausschließlich maternal vererbt (Giles et al., 1980). Das humane mtDNA-Genom umfasst 16.569 bp und liegt in 5-10 identischen Kopien pro Mitochondrion vor (Satoh et al., 1991). Das mitochondriale Genom des Menschen umfasst 37 Gene. Davon codieren 13 für Proteine, zwei für ribosomale RNAs und 22 für transfer RNAs. Alle übrigen Proteine im Mitochondrium sind kerncodiert und werden vom Cytosol aus in das Mitochondrium transportiert (Anderson et al., 1981).

Es wird zwischen dem Cytosin-reichen, inneren L-Strang (light strand) und dem Guanin-reichen, äußeren H-Strang (heavy strand) unterschieden.

Im Gegensatz zur nukleären DNA gelten 93 % des mitochondrialen Genoms als kodierend. Nur die Kontrollregion bzw. Displacement-Loop (D-Loop) ist nicht-kodierend. Der D-Loop markiert den Startpunkt für die Replikation des H-Stranges und setzt sich aus drei hypervariablen Bereichen (HV) zusammen: HV1, HV2 und HV3 (Strachan et al., 2005, Lutz et al., 2000) .

Im Gegensatz zur nukleären DNA ist die mtDNA nicht mit Histonen komplettiert und damit auch nicht in Nukleosomen organisiert (Kadenbach et al., 1995).

Die gesteigerte Produktion von Sauerstoff-Radikalen in der Atmungskette bedingt eine, im Vergleich zur nukleären DNA, bis zu zehnfach erhöhte Mutationsfähigkeit der mtDNA. Diese Mutationen bilden sich als Reaktion auf Sauerstoffradikale, die während der Elektronentransportkette entstehen können. Aufgrund weniger effizienter DNA-



Prinzipiell ist die mtDNA eines Individuums im gesamten Körper identisch. Es gibt aber Individuen, die mehr als zwei mtDNA-Haplotypen aufweisen. Dies wird als Phänomen der Heteroplasmie bezeichnet, die in drei Ausprägungen existiert:

1. Verschiedene Zellen besitzen unterschiedliche mtDNA.
2. Jedes Mitochondrion besitzt nur einen Haplotyp. In der Zelle kommen verschiedene Haplotypen vor.
3. Ein Mitochondrium besitzt verschiedene mtDNA Typen (Lutz et al., 2000).

### **1.4.3 4977 bp mtDeletion (dmtDNA<sup>4977</sup>)**

In der mtDNA existieren verschiedene Deletionen, wobei die 4.977-bp-Deletion die häufigste ist. Sie wird daher auch als „common deletion“ bezeichnet (Simonetti et al., 1992). Diese Mutation wird von zwei 13-bp-langen „direct repeats“, den sogenannten „hot spots“ flankiert, die an den Nukleotid-Positionen 8.470 – 8.482 bzw. 13.447 – 13.459 in der mtDNA lokalisiert sind.

Da eine oxidative Schädigung in den Mitochondrien zu einer begünstigten Trennung der Einzelstränge führt, wird davon ausgegangen, dass diese „hot spots“ für die Entstehung der 4977-bp-Deletion eine signifikante Rolle spielen (Lee et al., 1994).

Die Einzelstränge lagern sich bevorzugt an den Positionen mit „direct repeats“ aneinander, es kommt zur Schlaufenbildung, die wiederum das Herausbrechen und somit die Deletion begünstigen (Hou et al., 1996, Shenkar et al., 1996).

Die Tatsache, dass mit dem Verlust der dmtDNA<sup>4977</sup> wichtige Proteine der Atmungskette entfernt werden, ist ein Grund dafür, dass von der Änderung in der mtDNA-Sequenz viele Gene der oxidativen Phosphorylierungs-Maschinerie (z.B. ND3, ND4, ATPase 6 / 8) unmittelbar betroffen sind. Aufgrund dessen kommt es zu einer Verminderung der oxidativen Phosphorylierung und es entstehen weitere radikale Sauerstoffmoleküle, diese führen zu einer verstärkten oxidativen Schädigungen (Wallace et al., 1995). Dies führte zu der „vicious cycle theory“ (Miquel 1992).

Ab dem 20. Lebensjahr ist i. d. R. ein Anstieg der Menge an spezifisch deletierter mtDNA zu beobachten. Der Anstieg ist zu diesem Zeitpunkt bereits im Skelettmuskel nachweisbar und kann bei einem Alter von über 70 Jahren einen Prozentsatz von bis zu 0,14 % und mehr erreichen (Meissner et al., 1997, Corral-Debrinski et al., 1992). Im Vergleich zu anderen

Gewebe zeigt das Gehirngewebe eine hohe Anzahl oxidativer Schädigungen in der mitochondrialen DNA, die sich im Laufe des Alterungsprozesses anhäufen (Toescu et al., 2000).

Ausdifferenziertes Gewebe wie Gehirn (Corral-Debrinski et al., 1992, Soong et al., 1992, Storm et al., 2002, Fuke et al., 2008) und Skelettmuskel (Cortopassi et al., 1992, Meissner et al., 1997, Liu et al., 1998, von Wurmb-Schwark et al., 2002) weisen im Gegensatz zu schnell proliferierenden Geweben wie z. B. Haut (Yang et al., 1994, Berneburg et al., 1997) einen höheren Deletionsgrad auf. Jedoch schwankt die Deletionsrate in den verschiedenen Gehirnarealen erheblich. So lassen sich im Putamen und der Substantia nigra hohe Mengen nachweisen, während das Gewebe des Kleinhirns nur geringe Deletionsraten aufweist (Arnheim et al., 1992, Schwark et al., 1998). Ferner besteht ein Unterschied zwischen der grauen und der weißen Substanz. Soong et al., 1992 konnten nachweisen, dass die graue Substanz eine höhere Deletionsrate aufweist als die weiße. Somit wird davon ausgegangen, dass die Mutationen nicht in den Nervenfasern, sondern in den Nervenzellen auftreten.

### **1.5 Forensische Relevanz**

In der rechtsmedizinischen Praxis hat die Untersuchung von Proteinen als Biomarker bei bestimmten Fragestellungen wie z. B. bei der Wundalterbestimmung oder bei der Todesursachenklärung an Bedeutung zugenommen. Gerade die Analyse von Stressproteinen könnte dazu beitragen. So ist es schwierig, eine Hypothermie als Todesursache zu diagnostizieren, wenn alle klassischen Anzeichen wie z. B. Wischnewski Flecken und Kälte-Erytheme fehlen. Preuß et al. konnten zeigen, dass in Fällen von Hypothermie die Konzentration an Hsp70 in der Niere stark erhöht ist und die Hsp70-Konzentration im Gewebe ein zusätzliches Zeichen für eine Hypothermie sein kann (Preuss et al., 2008). In der forensischen Praxis ist die Altersbestimmung einer Wunde von größter Bedeutung, auch hier können Proteine als zusätzliche Marker in der Diagnostik verwendet werden (Laplante et al., 1998, McMurtry et al., 1999, Takamiya et al., 2008, Takamiya et al., 2009, Totan et al., 2011). Proteine sind somit als Biomarker vielseitig einsetzbar und für die Todesursachenermittlung ein bedeutendes Werkzeug.

## 1.6 Klinische Krankheitsbilder

### 1.6.1 Hypoxie

Bei einer mangelnden Sauerstoffversorgung des Gewebes kommt es zu einer Hypoxie. Es entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot (Madea et al., 2007).

Nicht jedes Gewebe ist einem Sauerstoffmangel gegenüber gleich empfindlich. Dies hängt maßgeblich von der Bedeutung des Organs für das Überleben des Organismus ab. Für den Grad der Gewebsschädigung entscheidend ist das Überschreiten der Irreversibilitätsschwelle oder „Point of no return“. Der Grad der Gewebsschädigung hängt zum einen von der Art, Dauer und Intensität der Hypoxydose ab und zum anderen davon, ob das Gewebe wieder durchblutet wird oder nicht (Adler et al., 1993).

Es wird zwischen **hypoxischer**, **anämischer** und **histotoxischer** Hypoxie unterschieden.

Eine **hypoxische** Hypoxie entsteht durch Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks infolge respiratorischer Insuffizienz oder durch Aufenthalt in großen Höhen. Bei dieser Art der Hypoxie wird das Gehirn durch eine Erhöhung des cerebralen Blutflusses geschützt.

Eine **anämische** Hypoxie resultiert aus einer Herabsetzung der Sauerstoff-Transportkapazität des Blutes aufgrund einer Verminderung des Hämoglobingehaltes (Anämie) oder durch Beeinträchtigung des Sauerstoff-Bindungsvermögens (z. B. bei Kohlenmonoxidvergiftung).

Infolge der Aufnahme von Giftstoffen wie z. B. Cyaniden (McPherson et al., 1986) und Sulfiden (Berntman et al., 1979) wird die Zellatmung der Mitochondrien blockiert, da sich diese Gifte an die mitochondrialen Elektronentransportenzyme binden (Song et al., 1983, Zhang et al., 1992, Wijdicks et al., 1994) und die Zelle den Sauerstoff nicht nutzen kann (Auer 2000). Die Ursachen für eine Hypoxie sind sehr vielfältig. So können Gefäßverengungen und Erkrankungen der Lunge ein Grund für das Auftreten einer Hypoxie sein. Aber auch Thrombosen, Embolien oder eine Herzinsuffizienz können Organe partiell oder komplett von der Sauerstoffversorgung abtrennen (Madea et al., 2007). Histologisch treten die ersten Veränderungen im Gehirn in Form von symmetrischen Pallidumnekrosen mit Ganglienzelluntergängen sowie Nekrosen in den subthalamischen Kernen, den Purkinjefasern des Kleinhirns, der Substantia nigra und dem Ammonshorn auf (Adler et al., 1993). Eine Hypoxie von mehr als drei Minuten führt zu irreversiblen Schädigung des entsprechenden Gewebes bis hin zum Gehirn-Tod der betroffenen Person (Madea et al.,

2007). Ein Rückgang der Körpertemperatur auf unter 25 °C führt zu einer Verlangsamung aller biologischen Prozesse (Adler et al., 1993). Sauerstoffmangel, Kreislaufversagen bis hin zum Herzstillstand können aufgrund der starken Unterkühlung des Körpers länger toleriert werden. Dies wird z.B. in der Herzchirurgie genutzt. Dort erlauben tiefe (28-18 °C) und ausgeprägte (18-4°C) Grade von künstlicher Hypothermie Kreislaufstillstandszeiten von 60 - 90 Minuten. (Madea 2003).

### **1.6.2 Alkoholkrankung**

In Deutschland gelten 1,3 Millionen Menschen als alkoholabhängig. Jedes Jahr sterben ca. 73.000 Menschen an den Folgen ihrer Alkoholsucht (Bundesregierung 2011). Dabei muss zwischen chronischer Alkoholabhängigkeit und Alkoholmissbrauch unterschieden werden. Zum Alkoholmissbrauch werden auch alkoholbedingte Folgeschäden im körperlichem, psychischem und sozialem Bereich gerechnet. Die Alkoholabhängigkeit wird durch das zusätzliche Auftreten von körperlicher und psychischer Abhängigkeit charakterisiert (Feuerlein 1989). Die genaue Diagnose und Einteilung erfolgt auf der Grundlage der International Classification of Diseases (ICD 10) der WHO (World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation). Die WHO unterscheidet die akute Alkoholisierung, den schädlichen Gebrauch und die Alkoholabhängigkeit (Tab. 2).

## Einleitung

**Tabelle 2: Klassifizierung der Alkoholerkrankung beruhend auf der Einteilung der WHO.** Die Einteilung erfolgt anhand der ICD10 in akute Alkoholisierung, schädlichen Gebrauch und Alkoholabhängigkeit. Um die Diagnose Alkoholabhängigkeit zu stellen müssen mindestens drei der Kriterien gleichzeitig, während des letzten Jahres aufgetreten sein (Schneider et al., 2002, WHO 2012).

ICD 10-Klassifikations- nummer	Diagnose	Kriterien der ICD 10 zur Diagnosestellung
<b>F10.0</b>	Akute Alkoholisierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ein vorübergehendes Zustandsbild nach Aufnahme von Alkohol mit Störungen des Bewusstseins, kognitiver Funktion, der Wahrnehmung, des Affektes, des Verhaltens oder anderer psychophysiologischer Funktionen und Reaktionen.</li> <li>• Die Störungen stehen in einem direkten Zusammenhang mit den akuten pharmakologischen Wirkungen der Substanz und nehmen bis zur vollständigen Wiederherstellung mit der Zeit ab, ausgenommen in den Fällen, bei denen Gewebeschäden oder andere Komplikationen aufgetreten sind.</li> </ul>
<b>F10.1</b>	Schädlicher Gebrauch	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eine tatsächliche Schädigung der psychischen und physischen Gesundheit des Konsumenten.</li> <li>• Eine akute Intoxikation alleine beweist noch nicht den Gesundheitsschaden.</li> </ul>
<b>F10.2</b>	Alkoholabhängigkeit  (Zur Diagnosestellung müssen mindestens <b>drei</b> der Kriterien gleichzeitig während des letzten Jahres aufgetreten sein.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ein starker Wunsch oder Zwang, Alkohol zu konsumieren.</li> <li>• Eine verminderte Kontrollfähigkeit bezüglich des Beginns, der Beendigung und der Menge des Konsums.</li> <li>• Ein körperliches Entzugssyndrom bei Beendigung oder Reduktion des Konsums.</li> <li>• Der Nachweis einer Toleranz.</li> <li>• Vernachlässigung anderer Vergnügen oder Interessen zu Gunsten des Substanzkonsums, erhöhter Zeitaufwand die Substanz zu beschaffen, zu konsumieren oder sich von den Folgen zu erholen.</li> <li>• Ein anhaltender Alkoholkonsum trotz des Nachweises eindeutiger schädlicher Folgen (z. B. Leberschädigung, depressive Verstimmungen).</li> </ul>

Chronischer Alkoholabusus führt vornehmlich zu Schäden in der Leber und im Gehirn (Lüllmann et al., 2011). Im Gegensatz zu Opiaten und Benzodiazepinen, die an spezifische Rezeptoren binden, greift Alkohol auf unterschiedlichen Wegen in die Informationsübertragung und den Zellstoffwechsel des Gehirns ein. Dies hat

## Einleitung

Funktionsveränderungen und den Untergang von Gehirnzellen zur Folge. Ferner kommt es durch toxische Abbauprodukte (z.B. Azetaldehyd) und die Auswirkungen internistischer Folgeerkrankungen zu weiteren Beeinträchtigungen der Gehirnfunktion. Der Alkohol greift in alle bekannten Neurotransmitter- und Rezeptorsysteme ein. So werden die G-Proteine und die Transkriptionsproteine des Zellkerns beeinflusst. Desweiteren verändert der Alkohol direkt die Struktur der Zellmembran und wirkt auf die spannungsabhängigen Kalziumkanäle. Diese Effekte sind abhängig von der Dosis, der Gehirnregion und der Dauer der Alkoholfuhr (einmalig oder chronisch) (Schneider et al., 2002).

### **1.6.3 Schädigung durch thermische Energie**

#### **1.6.3.1 Physiologische Thermoregulation**

Der Mensch ist ein homoiothermes Lebewesen. Die Körpertemperatur ergibt sich aus der Differenz zwischen Wärmeproduktion und -abgabe. Der Normwert für die Körperkerntemperatur liegt bei 36,5 - 37,0 °C.

Durch thermoregulatorische Vorgänge wird die Körperkerntemperatur konstant auf ihrem Sollwert gehalten. Zentrale und periphere Kälte- und Wärmesensoren dienen als Fühler dieses Regelkreises. Die zentralen (inneren) Thermosensoren befinden sich in der Regio praeoptica des vorderen Hypothalamus, der Medulla oblongata, im Rückenmark, der Bauchhöhle und der Skelettmuskulatur. Diese reagieren hauptsächlich auf Wärme. Die peripheren Thermosensoren sind spezielle freie Nervenendungen in der Haut. Hierbei sind Warmsensoren mit einem Reaktionsoptimum zwischen 40 - 45 °C (C-Fasern) von Kaltsensoren mit einem Reaktionsoptimum zwischen 32 und 16 °C (A $\delta$ -Fasern) zu unterscheiden. Bei Temperaturen  $\geq$  45 °C wird Hitzeempfindung ausgelöst und bei Temperaturen  $\leq$  17 °C Kälteempfindung (Jelkmann 2000).

Oberstes Steuerzentrum der Thermoregulation ist der posteriore Hypothalamus. Hier werden die Signale der Warm- und Kaltsensoren reziprok verschaltet. Zum zentralnervösen Vergleich der aktuellen Körpertemperatur und des Sollwertes werden die Informationen von den zentralen und peripheren Thermosensoren verrechnet. Unter physiologischen Bedingungen kann es zu einer Sollwert-Verstellung im hypothalamischen Temperaturzentrum kommen. Dies führt zur Entstehung von Fieber. Diese Sollwert-

Verstellung entsteht durch fiebererzeugende Pyrogene. Dies tritt vor allem während der Akutphase-Reaktion bei bakteriellen Infektionen auf (Jelkmann 2000).

### **1.6.3.2 Hyperthermie**

Anders als bei Fieber ist bei der Hyperthermie (Wärmestau) der Sollwert des hypothalamischen Temperaturreglers nicht verstellt. Die Überwärmung resultiert aus einer vermehrten Wärmebildung, die von außen auf den Körper einwirkt und / oder einer unzureichenden Wärmeabgabe. Eine Hyperthermie aufgrund äußerer Faktoren ist bedrohlicher als gleichhohes Fieber, da die Wärmeabgabemechanismen maximal aktiviert sind (Jelkmann 2000). Hitzeschäden können bei Kontakt mit Hitzequellen z. B. bei chemischen Verbrennungen, Verbrühung durch heiße Dämpfe oder Gase, erhitzten Festkörper und direkte Flammeneinwirkung auftreten. Hitzeschäden können aber auch durch Strahlung (z.B. Höhensonne oder Infrarot) und durch elektrischen Strom entstehen (Madea et al., 2007). Der Konsum von Alkohol und die Einnahme von Medikamenten (z. B. Diuretika oder Schilddrüsenhormone) können die thermoregulatorischen Fähigkeiten verschlechtern. Die höchste mit dem Leben noch zu vereinbarende Kerntemperatur des Menschen beträgt 42 – 43 °C. Das Missverhältnis zwischen Wärmeproduktion und Wärmeabgabe führt zu systemischen Störungen des Wärmehaushaltes.

Diese gliedern sich in:

- Hitzekrämpfe
- Hitzeerschöpfung
- Hitzschlag
- Sonnenstich

## Einleitung

Untersuchungen am Tiermodell haben gezeigt, dass die Thermotoleranz zunimmt, wenn der Organismus einige Stunden zuvor sublethal für 30-60 Minuten erwärmt wurde (Kapp et al., 1983, Li et al., 1983). Thermotoleranz ist die Folge einer vermehrten Bildung der protektiv wirkenden intrazellulären Stressproteine. Diese dienen dem Schutz der Zelle vor Proteinaggregationen oder falschgefalteten Proteinen, welche durch Hitze entstehen (Flanagan et al., 1995). Das Ausmaß der Schäden, die durch Hitze entstehen, ist abhängig von der Intensität und Dauer der Hitzeeinwirkung.

### **1.6.3.3 Hypothermie**

Unterkühlungen sind der Ausdruck eines erheblichen Ungleichgewichts zwischen erhöhtem Wärmeverlust und unzureichender Wärmebildung.

Alle Zustände mit einer Körperkerntemperatur  $< 35\text{ °C}$  werden als Hypothermie bezeichnet. Klinisch werden sie je nach Auskühlungszustand in leichte bis tiefe Grade eingeteilt (Madea et al., 2007). Kälte ist ein ubiquitäres Gefahrenmoment. Die Kältewirkung entfaltet sich nicht erst bei Temperaturen unter  $0\text{ °C}$  oder darunter. Auskühlungen oder Unterkühlungen können sich auch bei Temperaturen von über  $10\text{ °C}$  und sogar um  $20\text{ °C}$  entwickeln (z. B. in tiefer Narkose). Bei niedrigen Umgebungstemperaturen, die individuell unterschiedlich als Kälte empfunden werden, übersteigt trotz maximaler Engstellung der Hautgefäße die Wärmeabgabe die Wärmebildung. Wenn eine Wärmeneubildung durch Steigerung des Energieumsatzes nicht mehr gedeckt werden kann, setzt eine Hypothermie ggf. bis zum Kältetod ein. Eine längere Auskühlung des Körpers führt zu einer kälteinduzierten Diurese und damit zu einer Zunahme der Blutviskosität und Verringerung des Blutflusses. Bei tiefen Temperaturen entstehen Elektrolytverschiebungen, dabei wird Kalium aus dem Extrazellularraum in den Intrazellularraum verlagert bei weitgehend konstanten Natriumkonzentrationen. Diese Veränderung des Kalium/Natrium-Quotienten und die feste Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin bei gesteigerter Kohlendioxidlöslichkeit bewirken Kammerflimmern, Azidose und Hirnödem.

## Einleitung

Unterkühlungen treten meist akzidentell auf und vorwiegend in Verbindung mit Alkoholgenuss oder in Folge körperlicher Erschöpfung, konsumierender Krankheit und bei hohen Windgeschwindigkeiten (wind chill effect) (Madea 2003).

Örtliche Erfrierungen betreffen besonders die Akren von Finger, Zehen, Nase und Ohren (Madea 2003). Der Grad der Gewebeschädigung hängt von der Dauer der Kälteexposition ab.

Lokale Erfrierungen können in verschiedene Stadien eingeteilt werden:

- Dermatitis congelationis erythematosa
- Dermatitis congelationis bullosa
- Dermatitis congelationis gangraenosa

Die Expositionsdauer bis zum Tod durch Unterkühlung hängt neben dem bestehenden Gesundheitszustand maßgeblich von der Umgebungstemperatur ab und kann zwischen 1,5 Stunden und 12 Stunden schwanken (Madea et al., 2007). Stressproteine werden nicht nur bei Hitzeeinwirkung gebildet, sondern dienen vor allem auch als zellulärer Frostschutz (Tirapelli et al., 2010, Xia et al., 2011, Tveita et al., 2012).

## 1.7 Zielsetzung

Der menschliche Körper hat im Laufe der Evolution die unterschiedlichsten Mechanismen entwickelt, um auf Stressfaktoren wie z. B. UV-Licht, Hitze, Kälte und Sauerstoffmangel adäquat zu reagieren umso die Zellen und letztlich den Organismus zu schützen. Dabei ist es notwendig, die für viele Zellabläufe wichtigen Makromoleküle wie z. B. DNA und Proteine zu schützen bzw. stabil zu halten. Die Stressproteinsynthese gilt als eine der relevantesten zellulären Antworten auf Stressoren. Spezifische Stressproteine die so genannten heat shock proteins kurz HSP wirken der Zellschädigung durch Fehlfaltung oder Aggregation der Proteine entgegen, indem sie sich an diese binden und das Protein wieder in seine ursprüngliche Form zurückführen oder dafür Sorge tragen, dass falsch gefaltete Proteine abgebaut werden (Munk 2000).

Auch der Erhalt der genetischen Information ist für das Überleben der Zelle wichtig. Hier existieren diverse spezifische DNA-Reparaturmechanismen, die allerdings nicht immer wirksam sind. Dadurch entstehen verschiedene DNA-Veränderungen, die als Marker für zellspezifischen Stress angesehen werden können, von denen insbesondere die mitochondriale DNA betroffen ist.

In der Arbeit wird unter anderem untersucht, welchen Einfluss verschiedene, potentiell schädliche Faktoren auf der Protein-Ebene und der genetischen Ebene haben. Daraus entwickelt sich folgende Fragestellung: Inwieweit können bestimmte Veränderungen in einem forensischen Kontext z. B. zur Klärung der Todesursache eingesetzt werden? Dafür wird das menschliche Gehirn als Untersuchungsorgan gewählt, da dies eines der lebenswichtigen Organe des Körpers darstellt und innerhalb von Minuten auf schädigende Einflüsse wie z. B. Sauerstoffmangel reagiert. Um diese Prozesse zu analysieren, wird in drei Arbeitsschritten vorgegangen, die sich auch in den drei Teilbereichen dieser Dissertation wiederfinden: der Methodenetablierung und -validierung sowie der Pilotstudie zur Testung der Einsatzmöglichkeiten in der Forensik.

Zunächst steht im ersten Teil die Etablierung und Validierung adäquater Nachweismethoden im Vordergrund. Dabei wird besonderes Augenmerk auf eine bestmögliche qualitative und quantitative Nachweismethode für Mitglieder der HSPA-Familie gelegt. Im Weiteren sollen im zweiten Teil die neu etablierten Methoden auf ihre Eignung für die fortführende Analysen getestet werden. Dabei wird der Frage nachgegangen, inwieweit Ergebnisse, die aus

## Einleitung

frischem Material erhalten wurden, auch durch die Untersuchung von formalinfixierten Geweben erzielt werden können oder ob die Fixierung zu verfälschten Ergebnissen führt.

Im dritten Teil sollen die optimierten Methoden im Rahmen einer Pilotstudie angewandt werden. Hierfür werden 100 Gewebeproben (Großhirn und Kleinhirn) aus der forensischen Praxis analysiert. Es wird überprüft, in welcher Konzentration die beiden ausgesuchten Proteinmarker HSPA8 (konstitutive Form) und HSPA1A (induzierte Form) in den Gehirnbereichen vorkommen und ob es zu einem Konzentrations-Anstieg in Zusammenhang mit bestimmten Todesursachen wie z. B. Hyper- / Hypothermie, Hypoxie und Herzerkrankungen kommt. Parallel dazu wird die mitochondriale Mutagenese untersucht, wobei speziell die Induktion der 4977 bp Deletion sowie ein genereller Anstieg mitochondrialer DNA analysiert werden. Diese unterschiedlichen Befunde werden dann in Korrelation gesetzt. Daraus entstehen folgende Fragestellungen: Haben verschiedene äußere Faktoren wie z.B. Hitze, Kälte und Sauerstoffmangel, die auch todesursächlich sein können, einen direkten Einfluss auf die genannten Makromoleküle im Gehirngewebe? Und könnten spezifische Veränderungen wie die Expression von Stressproteinen oder die Akkumulation mitochondrialer Veränderungen als Zellmarker für diese Stressoren angesehen werden? Erkenntnisse hierüber wären hilfreich, da bei bestimmten Todesursachen wie z.B. einer Hypothermie typische Befunde fehlen können und eine Aussage bezüglich der Todesursache dann oft nur an Hand der Begleitumstände getroffen werden kann. Für diese Fälle würde die Kombinationsuntersuchung von DNA und Stressproteinen auf zwei unterschiedlichen molekularen Ebenen eine ideale Ergänzung zu den bisherigen Methoden darstellen.

Ferner dienen die Resultate dieser Arbeit der Fortsetzung der Forschungen über zellulären Stress, die schwerpunktmäßig am Institut für Rechtsmedizin in Kiel erfolgen. Bisher wurde die Stressantwort von verschiedensten Zellen u. a. im Blut und in unterschiedlichen Gehirnregionen auf molekulargenetischer Ebene durch Analyse der mitochondrialen Mutagenese untersucht. Der Nachweis spezifischer Stressproteine in dieser Arbeit dient der Weiterführung und der Komplettierung der vorhandenen Ergebnisse, zumal gerade bestimmte Stressproteine in engem Zusammenhang mit mitochondrialen Funktionen stehen.

## **2 Material**

Für diese Arbeit wurden 109 Obduktionsfällen ausgewählt, bei denen im Rahmen der Obduktion im Institut für Rechtsmedizin in Kiel routinemäßig Gewebe für weiterführende Untersuchungen entnommen und asserviert wurde. Die 109 Obduktionsfälle stammen aus den Jahren 2006 bis und 2011 (Tab. 12 und Tab. 33).

### **2.1 Auswahlkriterien für das Untersuchungsgut**

#### **2.1.1 Auswahlkriterien für das Gewebe zur Methodenetablierung und für die Formalinstudie**

Bei der Auswahl der Gewebe sowohl für die Etablierung der Methoden, als auch für die Formalinstudie wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

- Keine Probennahme bei Fäulnisercheinungen
- Keine Probennahme bei offenen Kopfverletzungen
- Keine Probennahme bei bekannter Alkoholkrankheit
- Keine Probennahme bei bekannter Drogen-oder Medikamentenabhängigkeit
- Keine Probennahme bei bekannter schwerer Infektionskrankheit (z.B. eine HIV-Infektion oder Hepatitis)

Außerdem wurden keine Proben entnommen, wenn die Verstorbenen durch ein Brandgeschehen zu Tode gekommen waren oder nach dem Tod längere Zeit im Wasser gelegen haben.

Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei - 80 °C asserviert.

### **2.1.2 Auswahlkriterien für das Untersuchungsmaterial**

Bei der Auswahl wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

- Die Probennahme erfolgte immer in den Bereichen Großhirn (frontal, rechte Hemisphäre, Höhe Balken) und Kleinhirn (rechte Hemisphäre mit Zahnkern)
- Keine Probennahme bei Fäulnisercheinungen
- Keine Probennahme bei Verstorbenen die nach dem Tod längere Zeit im Wasser gelegen haben
- Keine Probennahme bei bekannter schwerer Infektionskrankheit (z.B. eine HIV-Infektion oder Hepatitis)

Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei - 80 °C asserviert.

## **2.2 Gewebe für die Etablierung der Methoden**

Zur Austestung der Extraktionsmethoden wurden insgesamt neun Proben (Großhirn, Kelnhirn und Thalamus) von drei Obduktionsfällen des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel eingesetzt (siehe 2.1.1).

## **2.3 Gewebe für die Formalinstudie**

Als Untersuchungsgut für die Formalinstudie diente jeweils Groß- und Kleinhirngewebe von sechs Verstorbenen (drei Frauen und drei Männer) aus dem Obduktionsgut des Instituts für Rechtsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (siehe 2.1.1).

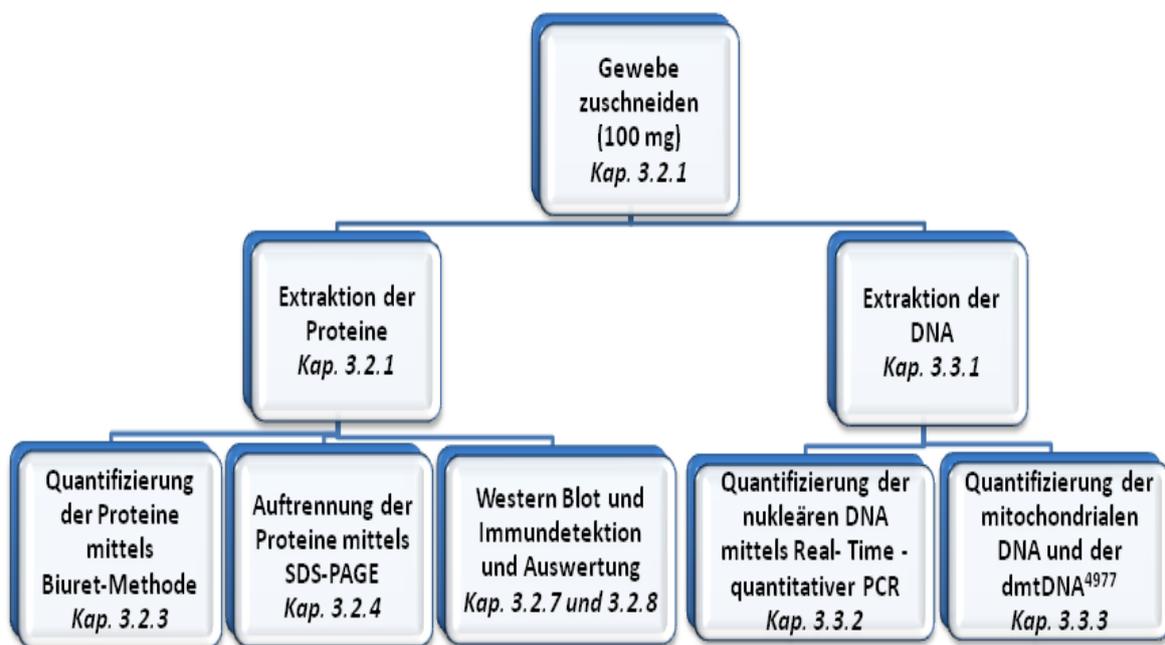
## **2.4 Untersuchungsmaterial**

Zur Untersuchung der verschiedenen Fragestellungen wurde Gehirngewebe, jeweils Großhirn (frontal, rechte Hemisphäre, Höhe des Balkens) und Kleinhirn (rechte Hemisphäre mit Zahnkern), aus dem Obduktionsgut des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel ausgewählt (siehe 2.1.2).

### 3 Methoden

#### 3.1 Probenbearbeitung

Jede Gewebeprobe wurde nach dem in Abb. 6 dargestellten Schema bearbeitet. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die isolierten Proteinproben bei - 20 °C und die extrahierten DNA-Proben bei + 5 °C im Kühlschrank gelagert.



**Abbildung 6: Flussdiagramm der Probenbearbeitung.** Jede der 400 Gewebeproben wurde nach diesem Schema bearbeitet.

#### 3.2 Proteinanalysen

##### 3.2.1 Extraktion aus frischem Gewebe

Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll von Ikeda et al., 1998 und Block, 2006 mit Hilfe des Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffers (RIPA) von Block, 2006 (modifiziert). Während der Etablierung wurden verschiedene Modifizierungen ausgetestet. Diese werden im Folgenden vorgestellt. Da die Methode E5 das beste Ergebnis lieferte, wurde diese für die Bearbeitung der Gewebeproben verwendet.

### **3.2.1.1 Extraktionsmethode 1 (E1)**

Alle Materialien und Puffer wurden im Gefrierschrank bzw. im Kühlschrank auf max. + 4 °C vorgekühlt.

Von den frischen Gewebeproben wurden jeweils 100 mg zugeschnitten, abgewogen und mit 1 ml RIPA-Puffer und 5,7 µl des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt, anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Stößels homogenisiert. Dieses Gemisch wurde zunächst bei 100 °C für 20 Min. erhitzt und darauffolgend für zwei Stunden bei 60 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Proben bei 4 °C für 20 Min. bei 15.000 upm zentrifugiert. Die Proteinlösung wurde bis zur Weiterverarbeitung bei - 20 °C eingefroren.

### **3.2.1.2 Extraktionsmethode 2 (E2)**

Abweichend zum vorherigen Protokoll wurde das Homogenisat für fünf Min. bei 100 °C erhitzt.

### **3.2.1.3 Extraktionsmethode 3 (E3)**

Die Extraktion erfolgte analog zu 3.2.1.1. Die Inkubationszeit bei 60 °C wurde auf eine Stunde verkürzt.

### **3.2.1.4 Extraktionsmethode 4 (E4)**

Hier wurde das Gewebe wie unter 3.2.1.1 erläutert vorbereitet und anschließend bei 0 °C für 15 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 ° und 15.000 upm (Block 2006).

### **3.2.1.5 Extraktionsmethode 5 (E5)**

Die Proteine wurden wie unter 3.2.1.1 extrahiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, je zehn µl EDTA sowie ProteoBlock™ Protease Inhibitor Cocktail (beides Fermentas) dazu gegeben und gemischt. Die isolierten Proteine wurden bis zur Weiterverarbeitung bei - 20 °C eingefroren.

### **3.2.1.6 Extraktionsmethode 6 (E6)**

Die Extraktion erfolgte wie unter 3.2.1.5 beschrieben, allerdings wurden die Proben zwei Stunden bei 80 °C (statt 60 °C) inkubiert.

## **3.2.2 Extraktion aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem**

### **Gewebe**

Die Proteinextraktion aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe wurde ebenfalls nach dem modifizierten Protokoll von Ikeda et al., 1998 durchgeführt. Es wurden zwei Möglichkeiten der Natriumdodecylsulfat- Konzentration im Extraktionspuffer (sodium dodecyl sulfate, Abk. SDS) getestet.

#### **3.2.2.1 Extraktion mit RIPA – Puffer (1 % SDS)**

Zunächst wurden die Schnitte in Xylen deparaffiniert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet. Das Gewebe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl RIPA-Puffer (0,1 % SDS) sowie 5,7 µl (Phenylmethylsulfonylfluorid) versetzt.

Die weiteren Extraktionsschritte entsprechen der Extraktion für Frischgewebe. Die isolierten Proteine wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Da das Gewebe für die Formalinstudie nicht in Paraffin eingebettet war, konnte auf die Deparaffinierung und Rehydrierung des Gewebes verzichtet werden.

#### **3.2.2.2 Extraktion mit RIPA – Puffer (2 % SDS)**

Abweichend zum vorherigen Protokoll wurde ein RIPA-Puffer mit 2 % SDS verwendet. Ansonsten erfolgte die Extraktion wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

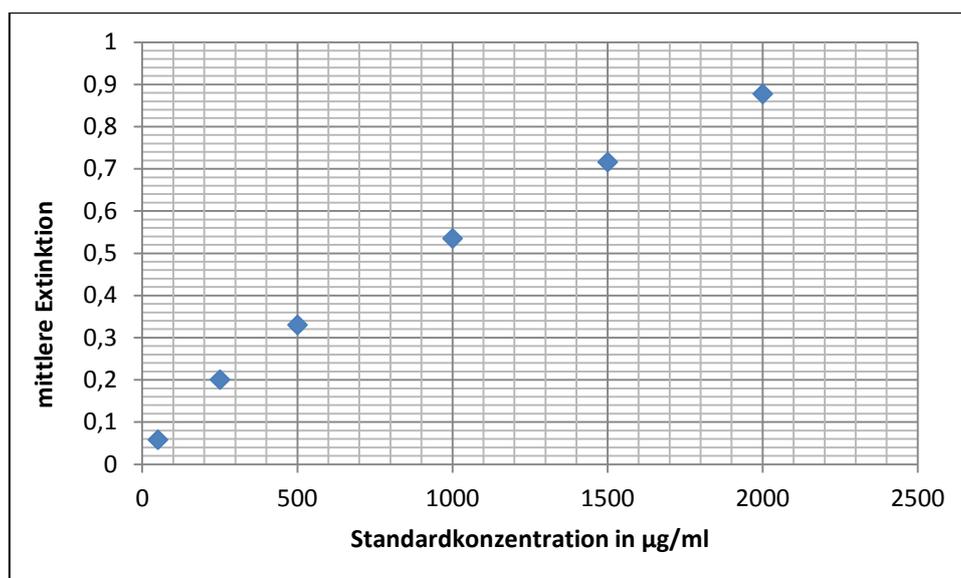
### 3.2.3 Proteinquantifizierung

Die Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Proben wurde mittels des kolorimetrischen Nachweises Roti® Quant universal von Roth bestimmt. Dieser basiert auf einer Biuret-Reaktion in Kombination mit einer hochspezifischen kolorimetrischen Enhancer-Reaktion. Im alkalischen Reaktionsmedium des Tests werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Reagenzes 2 zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Die Farbentwicklung der kupferspezifischen Enhancer-Reaktion ist direkt proportional zu der Konzentration des vorhandenen Proteins (Gebrauchsanweisung Roth). Als Standardprotein diente Bovine Serum Albumin im weiteren als BSA abgekürzt (Albumin Fraktion V, Roth). Vom BSA wurde eine Stocklösung ( $2.000 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) hergestellt, aliquotiert (2 ml) und bei  $-20^\circ \text{C}$  eingefroren. Zur Erstellung einer Standardkurve (Abb. 7) wurde aus der Stocklösung eine Verdünnungsreihe ( $25 - 2.000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) hergestellt. Die Standards und Proben wurden mit RIPA-Puffer verdünnt.

Für die Quantifizierung wurde der Makroansatz nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Proben wurden 1:10 verdünnt eingesetzt, um eine Messung im linearen Bereich zu gewährleisten. Die Absorptionsmessung der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 503 nm in Doppelbestimmung. Die Messung der Standards erfolgte in einer Dreifachbestimmung.

Die Konzentrationsberechnung erfolgte mit den Werten der Standardkurve durch das SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, BIORAD© (in  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Die in  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ermittelten Konzentrationen wurden anschließend in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  umgerechnet und dienten als Berechnungsgrundlage für die Gesamtproteinkonzentration (je  $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), die auf das Gel aufgetragen wurde.



**Abbildung 7: Darstellung der gemessenen Werte für die Standardkurve.** Als Standardprotein diente BSA (Albumin Fraktion V, Roth). Zur Erstellung der Standardkurve wurde aus der Stocklösung eine Verdünnungsreihe (50 -2000 µg/ml) gemessen. Die Konzentration der Standards wurde mittels des kolorimetrischen Nachweises Roti® Quant universal von Roth bestimmt. Für jeden Standard wurden drei Messungen durchgeführt.

### 3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Natriumdodecylsulfat (engl. Sodiumdodecylsulfat = SDS) ist eine Seife, die von den meisten Proteinen zu einem SDS-Protein-Komplex gebunden wird. Die große negative Ladung, die das SDS auf die Proteine überträgt, überdeckt die natürliche Ladung des Proteins. So behandelte Proteine weisen alle eine vergleichbare Form und ein ähnliches Ladung-Masse-Verhältnis auf.

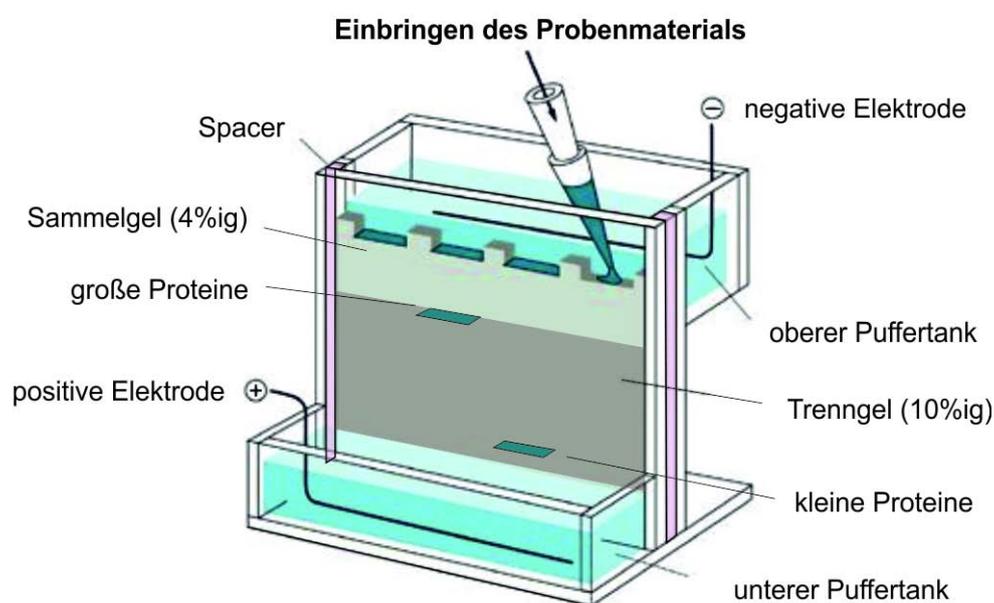
Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen modifiziert nach Laemmli (Laemmli 1970) wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Voet et al., 2010, Rehm et al., 2010). In dieser Arbeit wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell System von BIO-RAD für Gele mit einer Dicke von 1 mm verwendet.

Die Polyacrylamid-Konzentration des Sammelgels betrug 4 % und die des Trenngels 10 % (Tab. 8). Die verschiedenen Gelkomponenten wurden bis zur Zugabe von 10 % SDS, wie unter 8.4.2.4 beschrieben zusammengemischt. Die Zugabe von Tetramethylethylendiamin (Abk.: TEMED) und Ammoniumpersulfat (Abk.: APS) erfolgte erst kurz vor dem Gießen des Gels, da diese beiden Komponenten die Polymerisation des Gels auslösen. Zum Gießen der

## Methoden

Gele wurden zwei Glasplatten, eine davon mit dem 1 mm Spacer, in die Gießhalterung des Gießständers eingespannt. Zum Überprüfen, ob das System dicht ist, wurde etwas A. dest. in den Zwischenraum der beiden Glasplatten pipettiert. Nachdem das Wasser wieder entfernt wurde, konnte das flüssige Trenngel mit einer Pasteurpipette luftblasenfrei in den Zwischenraum pipettiert werden. Um eine glatte Oberkante zu erzeugen, wurde anschließend auf das noch flüssige Trenngel A. dest. pipettiert. Nach ca. 30 Min. konnte auf das feste Trenngel das Sammelgel gegossen werden. Der Kamm für zehn Taschen wurde vorsichtig zwischen die beiden Glasplatten gesteckt, solange das Sammelgel noch flüssig war. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel noch 1:4 mit dem Denaturierungsmix gemischt und vier Min. bei 94 °C aufgekocht. Danach wurde in die erste Tasche ein Größenmarker (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, BIO-RAD) pipettiert und die Proben in die übrigen Taschen. Anschließend wurde die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und der Deckel mit den Kontakten der Farbcodierung entsprechend justiert.

Die elektrophoretische Auftrennung für zwei Gele erfolgte bei 120 V und 110 mA für 90 Min. (Abb. 8). Danach wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung oder Silberfärbung detektiert oder auf eine Polyvinylidenmembran übertragen und mit spezifischem Antikörpernachweis detektiert.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Gelkammer für die SDS-PAGE (eigene Darstellung).** Das zwischen zwei Glasplatten befindliche Gel wird auf die eine Seite des Elektrodenelementes gespannt. Durch Einspannen eines zweiten Gels oder des Pufferdamms auf der gegenüberliegenden Seite wird der obere Puffertank geschlossen und mit SDS-Laufpuffer befüllt. Das Elektrodenelement wird in die Gelkammer (unterer Puffertank) gesetzt und bis zu der vom Hersteller angegebenen Markierung mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Der Deckel mit den integrierten Kontakten wird den Farbmarkierungen entsprechend auf die Elektroden gesetzt.

### **3.2.5 Coomassie-Färbung**

Während der Etablierung wurden verschiedene Färbemethoden ausgetestet. Die unter 3.2.5.3 beschriebene Methode lieferte die besten Ergebnisse.

#### **3.2.5.1 Färbvorschrift Roti® Blue (Roth)**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Anfärbung des Gels nach der Färbvorschrift von Roti® Blue (Rezepte der Lösungen siehe 8.4.3.1). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 60 Minuten in der Fixierlösung (Wasser, ortho-Phosphorsäure, Methanol) inkubiert. Anschließend wurde das Gel für drei Std. in einer Lösung aus Wasser, Methanol und Roti® Blue gefärbt. Danach wurde das Gel 5 Min. in der Waschlösung gewaschen. In der Stabilisierungslösung, die auf das Waschen folgt, kann das Gel über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Die Inkubation muss allerdings in einem dichtverschlossenen Behälter erfolgen, da bei Wasserverlust das Gel schrumpft. Nach der Stabilisierung der Färbung wurde das Gel in der Trocknerlösung inkubiert. Die Lösung musste nach 15 Min. ausgewechselt werden. Im Anschluss wurde das Gel in eine feste Folie eingeschweißt.

#### **3.2.5.2 Färbvorschrift Roti® Blue (Roth), modifiziert**

Die Anfärbung erfolgte wie unter 3.2.5.1. beschrieben, allerdings wurde in allen Lösungen das Methanol durch 2-Isopropanol ersetzt (Rezepte der Lösungen siehe 8.4.3.2).

#### **3.2.5.3 Färbvorschrift aus dem Laborjournal 2003, modifiziert**

Das Gel wurde nach der SDS-PAGE für 20 Min. oder länger direkt in der Färbelösung inkubiert. Das Entfärben (Wasser, Isopropanol, Essigsäure) erfolgte nach Sichtkontrolle. Anschließend wurde das Gel über Nacht in Wasser gelagert, damit die Banden am nächsten Tag klarer definiert sind (Rezepte der Lösungen siehe 8.4.3.3). Abschließend wurde das Gel in eine feste Folie eingeschweißt.

### 3.2.5.4 Färbevorschrift der Firma Serva

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel zunächst für 30 Min. in der Fixierlösung (Wasser, Essigsäure und Ethanol) fixiert. Direkt vor Gebrauch wurden jeweils 50 ml der Stocklösungen I und II gemischt und das Gel darin für 20 Min. angefärbt. Für eine erste schnelle Entfärbung wurde das Gel für 30 Sek. in Entfärber I (entspricht der Fixierlösung) gegeben. Im Entfärber II verblieb das Gel solange, bis die Banden klar definiert waren. Das entfärbte Gel wurde zweimal für fünf Min. in Wasser gewaschen (Rezepte der Lösungen siehe 8.4.3.4). Im Anschluss wurde das Gel in eine feste Folie eingeschweißt.

### 3.2.6 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist die sensitivste (< 1 ng Protein pro spot), nicht-radioaktive Färbemethode für Proteine. Silber-Ionen binden an Proteine. Durch die funktionellen Gruppen und die Peptidbindungen werden die Silber-Ionen zu metallischem Silber reduziert. Dabei werden sogenannte Kristallisationskeime gebildet. Während der Entwicklung findet die Reduktion von Silber-Ionen zu metallischem Silber bevorzugt an diesen Kristallisationskeimen statt. Deshalb werden Proteinspots schneller durch das Silber gefärbt (braun bis schwarz) als der Hintergrund.

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine durch eine 90-minütige Fixierung (Ethanol, Wasser, Essigsäure, Formaldehyd) immobilisiert und störende Begleitsubstanzen entfernt. Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 Min. in 50 %igem Ethanol gewaschen. Zur Sensibilisierung wurde das Gel 1 Min. in einer 0,02 %igen Natriumthiosulfat – Lösung inkubiert. Diese dient dazu, die anschließende Silberfärbung zu verstärken. Danach wurde dreimal für jeweils 20 Sek. mit Wasser gewaschen.

Die Anfärbung mit Silber erfolgte für 20 Min. in einer Lösung aus 0,2 %igem Silber, Formaldehyd und Wasser. Anschließend wurde das Gel zweimal jeweils 1 Min. in Wasser gewaschen.

Die Farbentwicklung erfolgte in der entsprechenden Entwicklerlösung (Natriumcarbonat, Formalin und Natriumthiosulfat) unter Sichtkontrolle, d.h. sobald der Marker die erste leichte braune Färbung zeigte, wurde das Gel aus der Entwicklerlösung genommen und zweimal für jeweils 30 Sek. in Wasser gewaschen. Zum Stoppen der Farbreaktion und zur

Konservierung wurde das Gel für 10 Min. in 1 %iger Glycinlösung inkubiert (Blum et al., 1987, Lerch 2001).

### **3.2.7 Western Blot und spezifischer Nachweis von Proteinen**

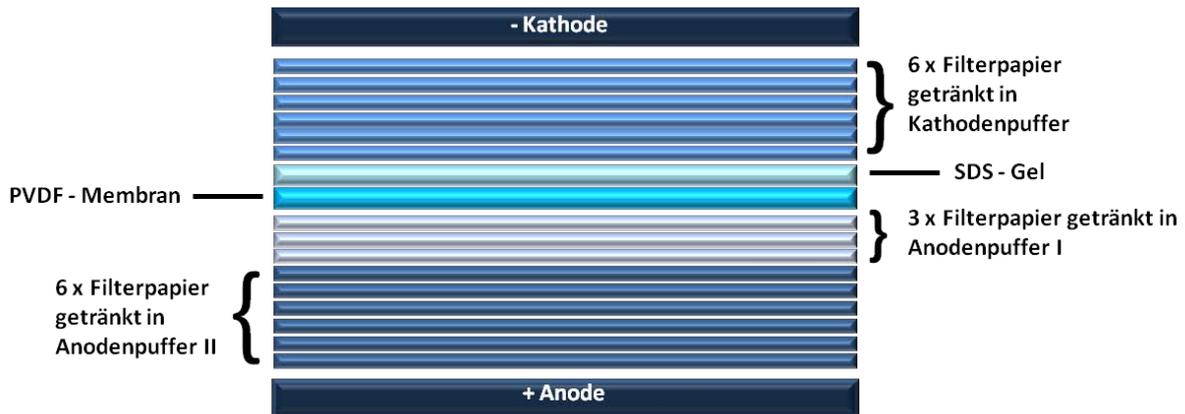
#### **3.2.7.1 Western Blot**

Zur spezifischen Detektion von HSPA1A und HSPA8 wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch ein Semi-Dry-Blot Verfahren (Abb. 9) auf eine ROTI®-PVDF-Membran (Polyvinylidenmembran, ROTH) übertragen. Dazu wurde die PVDF-Membran auf die Größe 8,5 x 5 cm zugeschnitten. Die Filterpapierstücke hatten die Masse 9,5 x 6 cm. Das aus der Gelkammer entfernte Gel wurde bis zum Zusammenbau des Blots im Kathodenpuffer gelagert. Nach Aktivierung der Membran in 100 %igem Methanol (15 Min.) wurde der Blot wie folgt aufgebaut (siehe Abb.8):

- 6 x Filterpapier getränkt in Anodenpuffer I (siehe 8.4.5.1)
- 3 x Filterpapier getränkt in Anodenpuffer II (siehe 8.4.5.2)
- Die aktivierte ROTI®-PVDF-Membran
- Das in Kathodenpuffer inkubierte Gel
- 6 x Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer (siehe 8.4.5.3)

Der so aufgebaute Blot wurde auf der Anodenplatte des Blot-Gerätes (EBU – 4000; C.B.S. Scientific CO) platziert und mit der Kathodenplatte abgedeckt. Der Gerätedeckel wurde mit Hilfe von zwei Schrauben fixiert. Die Übertragung für zwei Gele erfolgte bei 25 V und 100 mA für 90 Min.

## Methoden



**Abbildung 9: Aufbau eines Western Blots.** Der Blot besteht aus sechs Lagen Filterpapier getränkt in Anodenpuffer I und drei Lagen Filterpapier die in Anodenpuffer II inkubiert wurden. Darauf werden die Membran (aktiviert in 100 % Methanol) und das Gel (in Kathodenpuffer inkubiert) gelegt. Auf das Gel folgt eine Lage aus sechs Filterpapieren, die in Kathodenpuffer getränkt wurden. Der so aufgebaute Blot wird auf die Anodenplatte des Gerätes gelegt. Die Kathodenplatte wird oben auf den Blot gelegt und mit Hilfe des Gerätedeckels und Schrauben fixiert.

### 3.2.7.2 Antikörper

Antikörper sind Proteine, die zur Gruppe der Immunglobuline (Ig) gehören. Alle Immunglobuline bestehen aus vier Untereinheiten, zwei identischen **leichten Ketten (L)** von ca. 23 kDa und zwei identischen **schweren Ketten (H)** von 53 - 75 kDa. Diese assoziieren über Disulfidbindungen und nicht kovalenten Wechselwirkungen zu einem Y-förmigen Molekül, dessen Arme durch flexible Gelenkregionen miteinander verbunden sind (Abb. 10). Die Immunglobuline werden nach der Struktur der konstanten Regionen ihrer schweren Ketten in die fünf Klassen **IgG, IgA, IgM, IgD** und **IgE** unterteilt (Voet et al., 2010):

IgG kann durch das Enzym Papain proteolytisch in zwei identischen Fab-Fragmente (ab = Antigen-bindend) und ein Fc-Fragment (c = kristallisiert) gespalten werden.

Die Fab-Fragmente bilden die „Arme“ des Antikörpers und bestehen aus einer kompletten L-Kette und der N-terminalen Hälfte einer H-Kette und enthalten die IgG

Antigen-Bindungsstelle. Das Fc-Fragment besteht aus den C-terminalen Hälften der beiden H-Ketten. Die leichten Ketten verschiedener IgG-Antikörper unterscheiden sich hauptsächlich in den N-terminalen Hälften. Diese werden daher in eine **variable Region (V<sub>L</sub>)** bestehend aus 1–108 AS und eine **konstante Region (C<sub>L</sub>)** aus 109-214 AS unterteilt. Die schweren Ketten bestehend aus 446 Aminosäuren weisen ebenfalls eine **variable (V<sub>H</sub>)** und

## Methoden

eine **konstante Region (C<sub>H</sub>)** auf. Die C<sub>H</sub>-Region ist aus drei Segmenten von je 110 AS, aufgebaut (**C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>**) und sind zueinander und zu C<sub>L</sub> homolog (Abb. 9).

Alle homologen Einheiten der Immunglobuline zeigen dieselbe charakteristische Faltung aus drei- und viersträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden.

Die Fähigkeit der Antikörper sich auf die vielfältigsten Antigene einzustellen, liegt in den drei Schleifen der variablen Domäne. Die meisten Unterschiede in den Aminosäuresequenzen zwischen den Immunglobulinen konzentrieren sich auf diese drei Segmente, die als **hypervariable Sequenzen** bezeichnet werden. Entsprechend der Position der hypervariablen Sequenzen befindet sich die Antigen-Bindungsstelle an der Spitze jedes Fab-Fragments in einer Spalte zwischen ihren V<sub>L</sub>- und V<sub>H</sub>-Domänen.

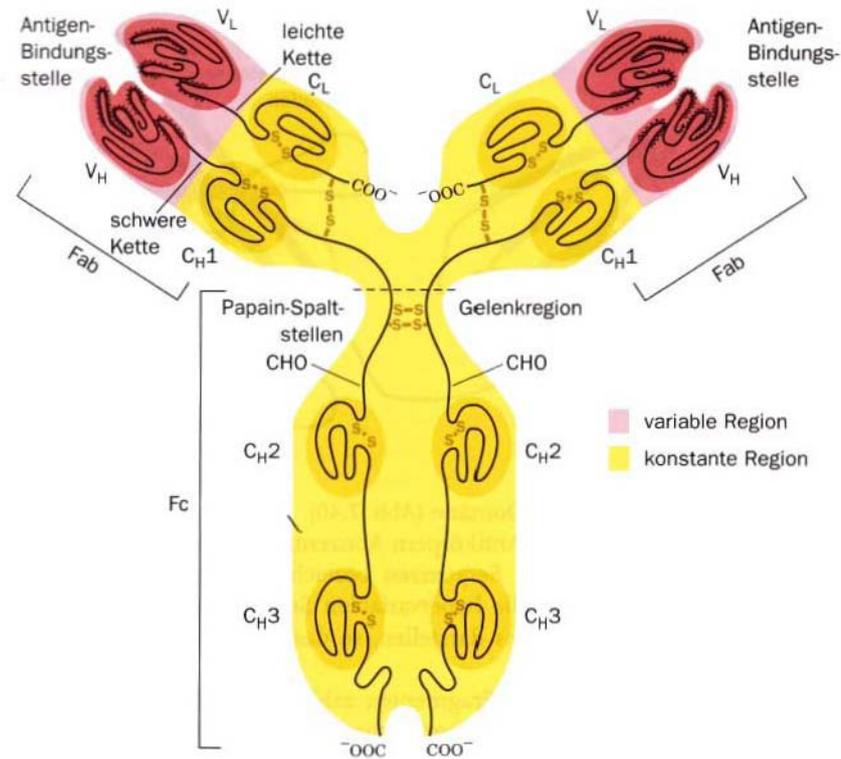
Für die Bindung zwischen Antikörper und Antigen sind van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe und ionische Wechselwirkungen verantwortlich. Die Spezifität und Stärke eines Antigen-Antikörper-Komplexes ergeben sich aus der einzigartigen strukturellen Komplementarität zwischen Antigen und Antikörper.

Die meisten Antikörper sind divalent, d.h. sie können gleichzeitig zwei identische Antigene binden. IgM und IgA sind multivalent.

Antikörper können in zwei Formen vorkommen. Als **monoklonale Antikörper**, die sich gegen ein einziges Epitop richten und von einer auf eine einzige B-Lymphozyte zurückgehende Zelllinie stammen. **Polyklonale Antikörper** binden dagegen an verschiedene Epitope eines Antigens und stammen von verschiedenen B-Lymphozyten (Voet et al., 2010, Roitt 1993).

Beide Antikörper-Formen finden Anwendung in verschiedensten immunchemischen Methoden wie z.B. Immunhistochemie oder der Immundetektion beim Western Blot.

## Methoden



**Abbildung 10: Schematische Darstellung eines menschlichen Immunglobulins der Klasse G.** Der Antikörper besteht aus vier Untereinheiten: zwei identischen leichten Ketten (L) und zwei identischen schweren Ketten (H). Jede leichte Kette enthält eine variable (VL) und eine konstante (CL) Region. Jede schwere Kette enthält eine variable (VH) und drei konstanten (CH1, CH2, CH3) Regionen. Die hypervariablen Sequenzen kennzeichnen die Position der Antigen – Bindungsstelle. Diese befindet sich an der Spitze jedes Fab – Fragments in einer Spalte zwischen ihren VL – und VH – Domänen (aus Voet, et al., 2010).

### 3.2.7.3 Immundetektion

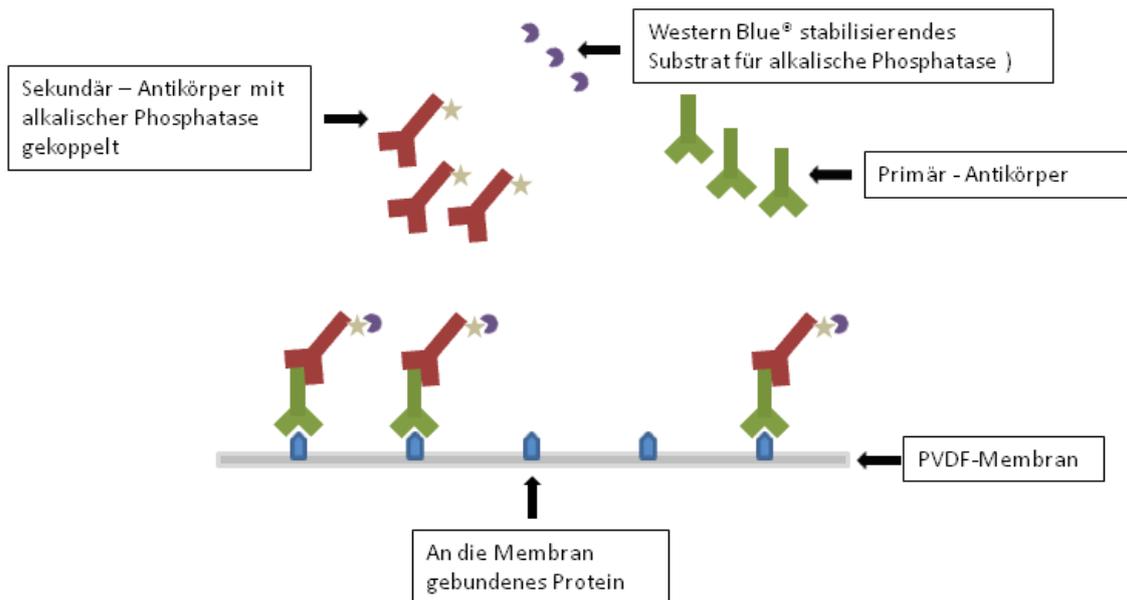
Die Immundetektion der auf der Membran fixierten Proteine erfolgt in einem drei Stufen Nachweisverfahren (Abb. 11). Der Vorteil gegenüber der direkten Methode liegt in der größeren Sensitivität, da der Primärantikörper nicht durch Markierung geschwächt wird und es zudem zu einer Verstärkung des Signals kommt.

Nach dem Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran wurde diese zunächst in 1 x TTBS gewaschen und anschließend für eine Stunde in Blockierlösung (4 % Milchpulver in 1 x TTBS gelöst) inkubiert. Die Blockierung dient der Absättigung freier Bindungsstelle auf den jeweiligen Oberflächen. Diese Absättigung wird erreicht, indem alle freien Oberflächen mit einer möglichst lückenlosen Schicht von Molekülen belegt werden.

Nach der Blockierung erfolgte die Behandlung mit dem Primärantikörper (anti HSPA1A/HSPA8, Kombinationsantikörper). Dieser wurde 1:1500 mit Blockierlösung verdünnt. Die Inkubation erfolgte in einem geschlossenen Plastikbehälter bei Raumtemperatur, über Nacht und unter sanftem Schütteln.

Am nächsten Tag wurde die Membran mehrmals mit 1 x TTBS gewaschen, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Primärantikörper, zu entfernen, bevor die Membran mit dem Sekundärantikörper (anti Maus, 1:7500 verdünnt mit 1 x TTBS) inkubiert wurde. Dieser Antikörper richtete sich spezifisch gegen den Primärantikörper und war mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt. Es folgten weitere Waschschriffe, die wieder dazu dienten unspezifisch oder nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation mit einem Substrat (Western Blue<sup>®</sup>, Promega<sup>™</sup>), das durch die alkalische Phosphatase unter Farbentwicklung umgesetzt wird. Im positiven Fall waren die Banden violett gefärbt.

## Methoden

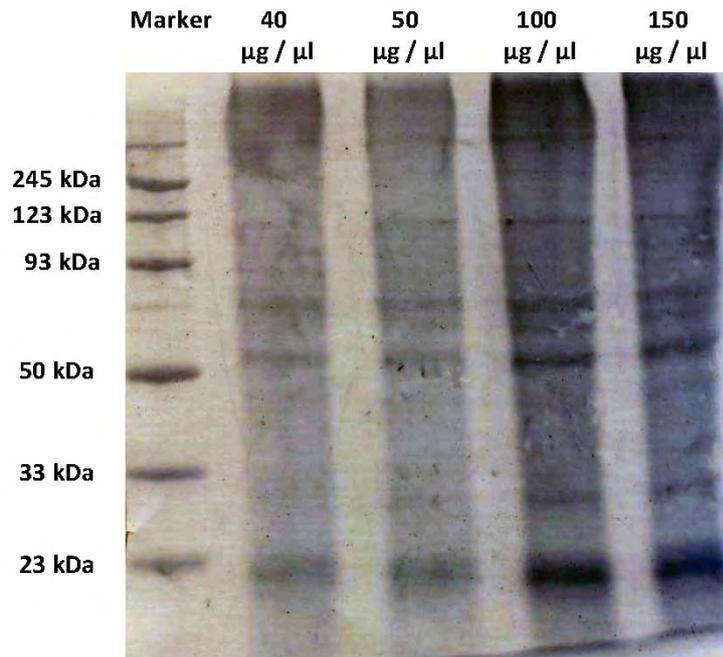


**Abbildung 11: Immundetektion der membrangebundenen Proteine.** Der Primär – Antikörper bindet an das membrangebundene Protein. In dieser Arbeit wurde ein Kombinationsantikörper verwendet, der an HSPA1A und HSPA8 bindet. An diesen bindet der mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundär – Antikörper (anti – Maus). Durch Zugabe eines Substrates, das durch die alkalische Phosphatase enzymatisch zu einer violetten Farbe umgesetzt wird, werden die Proteine nachgewiesen.

### 3.2.7.4 Amidoschwarzfärbung zur Überprüfung des Bloterfolgs

Die Färbung der Membran mit Amidoschwarz (Abb. 12) war nicht reversibel und unspezifisch, d.h. es wurden alle aufgetrennten und übertragenen Proteine angefärbt. War die Membran vor der Färbung bereits trocken, so musste sie für einige Min. in 100 % Methanol wieder aktiviert werden, da sonst keine Anfärbung der Proteinbanden erfolgte. Zunächst wurde die Membran für 10 Min. in der Färbelösung (0,1 % Amidoschwarz, 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt) inkubiert. Anschließend wurde die Membran im Entfärber (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt) für 5-10 Min. inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar und die Hintergrundfärbung minimiert sind. Gegebenenfalls der Entfärber zwischendurch zu wechseln. Abschließend wurde die Membran auf einer saugfähigen, glatten Unterlage getrocknet (Roth 2009).

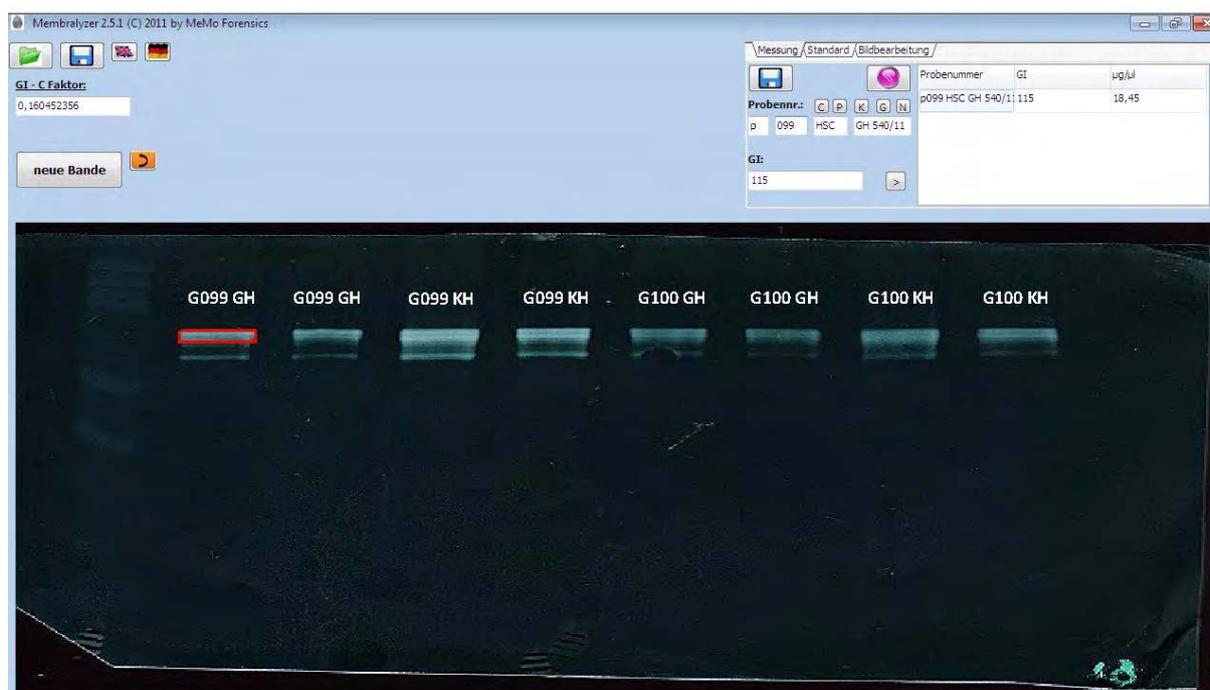
## Methoden



**Abbildung 12: Membran nach der Färbung mit Amidoschwarz.** Es handelt sich um eine irreversible Färbung, die zur Transferkontrolle nach erfolgtem Western Blot durchgeführt wird. In der ersten Bahn ist der Größenmarker zu sehen. In den weiteren Bahnen wurden verschiedene Konzentrationen an Gesamtprotein aufgetragen. Es zeigt sich das 40  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  Gesamtprotein noch sehr gut mit dieser Färbung zu detektieren ist.

### 3.2.7.5 Quantitative Auswertung der Signale mittels Membralyzer Software (Version 2.5.1)

Zur Quantifizierung der spezifischen HSP70-Superfamilie-Proteine werden die Membranen aus dem Western Blot eingescannt und mit der Membralyzer Software zunächst normalisiert und invertiert. Anschließend werden die spezifischen Banden markiert und mit der Membralyzer Software (Version 2.5.1) quantifiziert (Abb. 13). Diese Software wurde im Rahmen einer Diplomarbeit im Institut für Rechtsmedizin am UKSH in Kiel entwickelt (Modrow 2011).



**Abbildung 13: Quantifizierung der Signale auf der Membran mit Hilfe der Membralyzer Software 2.5.1.** Dargestellt ist ein Screenshot dieser Software mit Proben aus dem Untersuchungsgut. Nachdem die Membranen normalisiert und invertiert wurden, wurden die Banden markiert und automatisch analysiert. Die ermittelten Werte werden oben rechts in dem Fenster angezeigt.

### 3.2.8 Immunhistochemischer (IHC) Nachweis von Proteinen

Der immunhistochemische Nachweis der Proteine erfolgte nach der Avidin-Biotin-Komplex Methode (ABC-Methode). Diese macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zu Nutze. Avidin ist ein Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin, welches ein wasserlösliches Vitamin ist. Da es bei der Verwendung von Avidin häufiger zu unspezifischen Reaktionen kommen kann, wurde in dieser Arbeit Streptavidin, aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*, verwendet. Für die ABC-Methode wurde ein Brückenantikörper benutzt, der mit Biotin markiert ist (biotinyliert). Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der ABC-Methode (Lang 2006).

#### 3.2.8.1 Einbetten der Proben in Paraffin

Die zugeschnittenen Gewebestücke wurden in je eine beschriftete Plastikkassetten gelegt und in einem Behälter mit Wasser inkubiert. Die Dehydrierung wurde in dem Shandon, Hypercenter XP (Thermo Scientific) über Nacht durchgeführt (Programm siehe Anhang

## Methoden

8.5.1). Sie dient der Aushärtung des Gewebes und führt zu einer besseren Schnittqualität (Stein et al., 1998). Nach der Dehydrierung wurden die Kassetten bis zur Einbettung in einem Wärmeschrank (37 °C) gelagert, damit die Gewebe die Temperatur des letzten Paraffinbades bis zum Einlegen in den Winkelrahmen beibehalten. Danach wurden die Gewebe manuell in Paraffin eingebettet. Dazu wurden auf einer Kühlplatte aus den Winkelrahmen Rechtecke geformt. Die Kühlplatte beschleunigt durch Kühlung die Aushärtungsphase und erleichtert so das Schneiden. In die Winkelrahmen wurde flüssiges Paraffin gegossen und das Gewebestück aus dem Wärmeschrank mit der zu untersuchenden Seite nach unten darauf gelegt. Dazu wurde eine Pinzette benutzt, die vor dem Aufnehmen des Gewebestücks kurz in der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt wurden, damit das Stück sich leicht löst und gut platzieren lässt. Anschließend wurde mit Paraffin bis kurz unter den Rand aufgefüllt. Sobald das Paraffin oben eine dünne, feste Schicht gebildet hatte, wurde ein Zettel, welcher zuvor in flüssiges Paraffin getaucht wurde, mit der Probennummer eingelegt und in der Folge durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen. Nachdem die Paraffinblöcke ausgehärtet waren, wurden die Metallwinkel entfernt und die Blöcke bis zur weiteren Verwendung in Transporttaschen bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.2.8.2 Zuschnitt der Proben**

Die Gewebeblöcke wurden ca. 30 Min. vor dem Zuschnitt in den Kühlschrank gelegt, da sich kalte Blöcke besser schneiden lassen und dadurch weniger zerreißen. Für den Zuschnitt wurde ein Schlittenmikrotom der Firma Jung verwendet. Nach dem Anschnitt der Blöcke wurden jeweils 6 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden zunächst auf eine Glasplatte mit kaltem A.dest. gelegt. Anschließend wurden die Schnitte zur Glättung in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Jeder Schnitt wurde danach auf einen SuperFrost® Plus Objektträger (Thermo Scientific) aufgezogen und in einem Ständer über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C (MEMMERT) getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger bis zur immunhistochemischen Untersuchung in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.2.8.3 Hämatoxylin – Eosin - Färbung (HE – Färbung)**

Jeweils ein Schnitt pro Block wurde mit der HE-Färbung angefärbt. Die HE-Färbung diene als Orientierungshilfe und zur Differenzierung der Gewebeschichten, da es durch die Färbung möglich ist, im Vorfeld eine Beurteilung der Schnittqualität vorzunehmen. Mit der HE-Färbung ist eine Unterscheidung der feingeweblichen Strukturen des Gewebeschnittes möglich. Die Färbung der Schnitte wurde im Routinebetrieb des Histologie-Labors der Rechtsmedizin-Kiel durchgeführt.

### **3.2.8.4 Immunhistochemie**

Für den Nachweis der Stressproteine HSPA1A und HSPA8 im Gewebeschnitt wurde ein Antikörper (Anti-Hsp70/Hsc70, clone N27F3-4, Stressmarq) verwendet, der spezifisch an beide Proteine bindet. Als biologische Positivkontrollen wurden Schnitte aus der Haut der Halsregion verwendet. Hier ist bekannt, dass sich aufgrund von UV-Licht und anderen Stressfaktoren vermehrt HSPA1A und HSPA8 in den Zellen bilden und somit im IHC positiv reagieren (Calabrese et al., 2001, Kwon et al., 2002, Morris 2002). Als biologische Negativkontrollen wurden Schnitte von Leberpräparaten (Personen mit Schuss- oder Stichverletzungen, keine Stresseinwirkung) benutzt. Zusätzlich wurde eine methodische Negativkontrolle mitgeführt, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen. Bei dieser Probe wurde der Primärantikörper durch TBS-Puffer ersetzt.

Es wurde das Immunhistochemistry-Kit der Firma Biochain verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit einigen Modifizierungen nach Schütt (Schütt 2008).

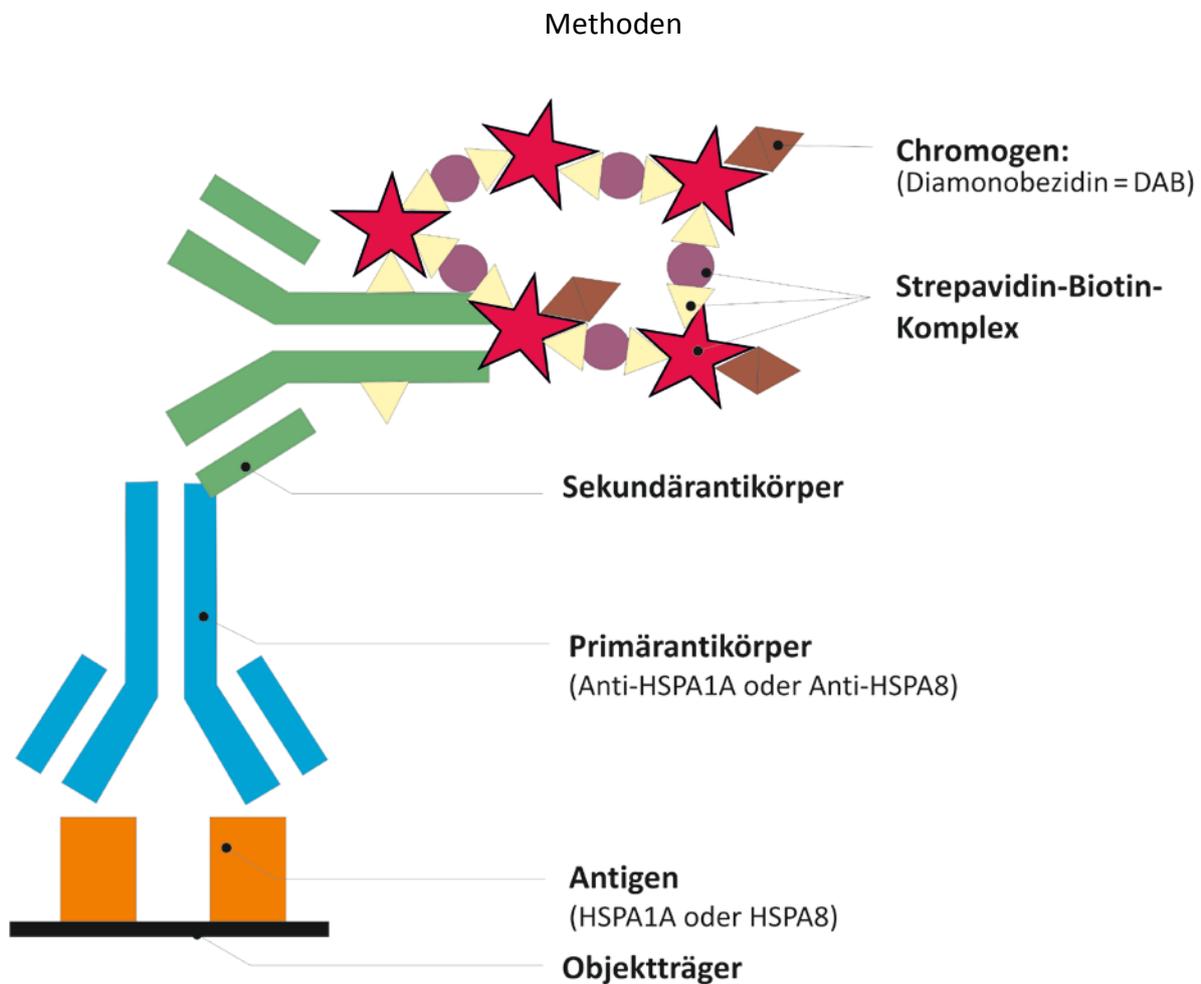
Zunächst wurden die 4 µm dicken Schnitte zur Entparaffinierung zweimal für je 15 Min. mit Roticlear® (ROTH) behandelt. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe (10 Min. 100 %, je fünf Min. 100 %, 95 %, 70 % und A.dest) gestellt. Da es durch die Fixierung mit Formalin zu starken Vernetzungen im Gewebe gekommen ist, kann der Primärantikörper gar nicht oder nur schwer an das entsprechende Epitop binden (Werner et al., 2000, Lang 2006). Die Antigen-Demaskierung ermöglicht es, die Bindestellen für den Primärantikörper wieder zugänglich zu machen. Für die Demaskierung wurden die Schnitte zunächst für 1 Min. bei höchster und dann für weitere 8 Min. bei niedrigster Stufe der Mikrowelle in Citratpuffer (pH 6,0) inkubiert.

Danach wurden die auf Raumtemperatur abgekühlten Präparate für 30 Min. in 3 %iges Wasserstoffperoxid gestellt. Dies diene der Deaktivierung der gewebeeigenen Peroxidase

## Methoden

und der Vermeidung falschpositiver Ergebnisse. Anschließend wurden die Schnitte in A.dest. und TBS für je 3 Min. gewaschen. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Zellstoff vom den Objektträgern entfernt und 1 %iges Normalserum für 30 Min. auf die Gewebeschnitte gegeben, um die Hintergrundfärbung gering zu halten und unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Serum abpipettiert und der Primärantikörper (1:200 mit TBS-Puffer verdünnt) auf die Schnitte gegeben und über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Präparate drei Mal für je 5 Min. in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (1:10 verdünnt) für 30 Min. Nach erneutem Waschen mit TBS –Puffer (je drei Mal) wurden die Proben mit der kurz vorher angesetzten Detektionslösung für 30 Min. inkubiert. In diesem Schritt setzen sich die gebildeten Streptavidin–Biotin–Komplexe an den Sekundärantikörper. Dies führte im Weiteren zu einer Signalverstärkung. Nach Entfernung der Detektionslösung wurden die Schnitte mit der frisch angesetzten Entwicklerlösung bedeckt. Die Inkubationszeit kann zwischen fünf bis 30 Min. dauern. Die Farbreaktion war unter dem Mikroskop zu beobachten und konnte durch Eintauchen des Schnittes in A.dest. gestoppt werden. Im positiven Fall wird das Chromogen Diamonobezidin (DAB) durch die Reaktion mit der Peroxidase zu einem braunen Farbprodukt. Anschließend wurde eine Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt (siehe Punkt 8.4.8.3). Dazu wurden die Schnitte 7 Min. in Mayer´s Hämalaun inkubiert und für 10 Min. unter fließendem Wasser gebläut. Hinterher wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 Min. in 70 %, 95 %, 100 %) dehydriert und zweimal für je 10 Min. in RotiClear® (ROTH) inkubiert. Zuletzt wurden die Präparate mit einem Einbettmedium (VitroClud, Langenbrinck) eingedeckt.



**Abbildung 14: Schema der ABC – Methode (eigene Darstellung).** Der Primärantikörper bindet an das Antigen (HSPA1A und HSPA8) im Gewebeschnitt. In der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode ist der Sekundärantikörper mit Biotin konjugiert und fungiert als Bindeglied zwischen gewebegebundenem primärem Antikörper und dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex.

### 3.3 DNA – Analysen

#### 3.3.1 DNA Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das Invisorb SpinTissue Kit<sup>®</sup> der Firma Invitex verwendet. Zunächst wurden mit einem Skalpell von jedem Gewebe 100 mg (abweichend vom Manual) von den angetauten Proben abgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 400 µl Lysispuffer G sowie 40 µl Proteinase K zu jeder Probe und die Inkubation über Nacht bei 52 °C im Thermoschüttler.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei 15.000 upm und 4 °C für 20 Min. zentrifugiert (abweichend vom Manual). Diese Veränderung musste aufgrund der Beschaffenheit vom Gehirngewebe vorgenommen werden, da sich nach zwei Min. noch keine ausgeprägte

## Methoden

Phasen gebildet hatten und die Flüssigkeit nur schwer abpipettieren war. Danach wurden die Überstände in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und mit 200 µl Bindingbuffer T versetzt. Die Gemische wurden gevortext und auf bereits vorbereitete Membraneinsätze in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde für 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einer Zentrifugation bei 12.000 upm für 2 Min. wurden die Filtrate verworfen und die Membraneinsätze mit 550 µl Waschpuffer versehen. Es folgte eine Zentrifugation für 1 Min. bei 12.000 upm. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die Proben wurden abschließend für 2 Min. mit 13.000 upm zentrifugiert.

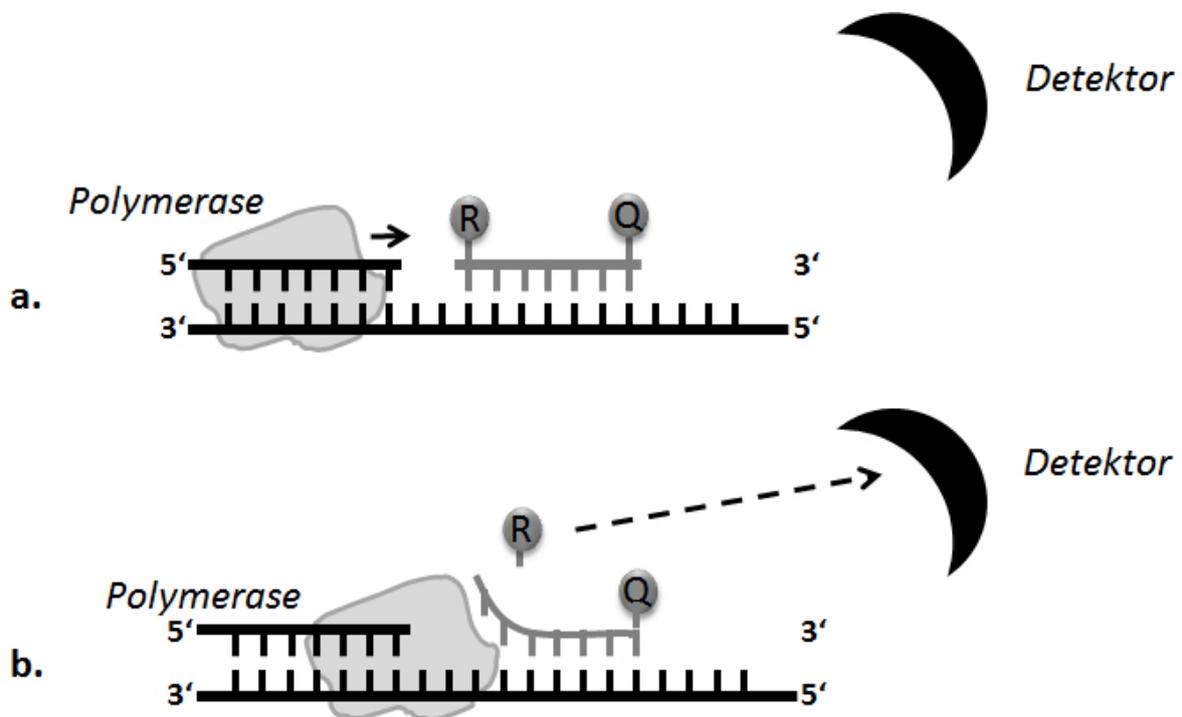
Anschließend wurden die Membraneinsätze in neue 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße gesetzt und mit 60 µl vorgewärmtem Elutionspuffer (52 °C) versehen. Nach einer Inkubationszeit von 3 Min. bei Raumtemperatur wurden die Proben für 2 Min. bei 10.000 upm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal durchgeführt. Das Eluat enthielt die extrahierte DNA. Diese Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 5 °C im Kühlschrank gelagert.

### 3.3.2 Realtime (Echtzeit) quantitative PCR (RTq – PCR)

Die Realtime (Echtzeit) quantitative PCR ermöglicht eine akkurate Bestimmung der DNA-Menge und Qualität einer Probe (Butler 2011). Der PCR – Reaktion wird dabei ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid hinzugefügt, das zwischen dem Vorwärts - Primer und Rückwärts-Primer hybridisiert. Am 3'-Ende verfügt dieses Oligonukleotid über ein Didesoxynukleotid oder eine Phosphatgruppe und kann dadurch nicht als Startpunkt fungieren. Trifft die Taq-Polymerase während der Neustrangsynthese auf das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid, wird es abgebaut und der Farbstoff freigesetzt.

Die Analyse-Methode, die zu Anwendung kam, wird als **TaqMan – Prinzip** (Abb. 15) bezeichnet (Livak et al., 1995). Dabei besitzt das dritte Oligonukleotid zwei Fluorochrome, die als Reporter (reporter) und Löscher (quencher) bezeichnet werden. Solange das Oligonukleotid intakt ist, kann es nicht detektiert werden, da der Quencher dies verhindert. Wird jedoch der Reporter von der Polymerase freigesetzt, ist eine Detektion über den Fluoreszenzdetektor des RT-qPCR Geräts möglich. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto

mehr Reporter-moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke in der Wellenlänge des Reporter-Farbstoffes an (Holland et al., 1991, Mülhardt 2009).



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der RTq-PCR (Darstellung Modrow, 2011).** 1.) Die Primer und die farbmarkierte Sonde lagern sich an ihre spezifische Sequenz an und die Polymerase verlängert den Strang in 5' – 3'- Richtung Reporter und Quencher neutralisieren sich. Der Detektor kann nichts detektieren. 2.) Die Taq - Polymerase spaltet durch ihre 5' – 3' - Exonukleaseaktivität die Sonde, der Reporter wird getrennt und nicht länger vom Quencher neutralisiert. Der Detektor ermittelt eine Veränderung der Fluoreszenz Die Sonde löst sich vom DNA – Strang und die Elongation läuft weiter (Livak et al., 1995).

Die Analyse aller Proben erfolgte in Dreifachbestimmung, die der Standards in Doppelbestimmung. Bei jeder PCR (RTq – PCR nDNA und mtDNA) wurden Negativkontrollen mitgeführt, um Kontaminationen ausschließen zu können. Zur Kontaminations-Vermeidung wurden nur DNA-freie Materialien verwendet, Einmal-Schutzkleidung (Handschuhe, Kittel) getragen und unter einer DNA – Arbeitsstation gearbeitet. Diese wurde vor jeder Benutzung mit Bleiche gereinigt.

### 3.3.2.1 Quantifizierung der nukleären DNA (nDNA)

Für die absolute Quantifizierung der nukleären DNA wurde eine, im Institut für Rechtsmedizin am UKSH in Kiel, selbst entwickelte PCR verwendet (von Wurmb-Schwark et

al., 2008). In dieser PCR wurde ein 98 bp großes Fragment aus dem Telomerase-Gen amplifiziert. Dies wurde mit einer NED-markierten Sonde detektiert. Bei jeder Analyse wurden Standards (0,02 ng, 0,2 ng, 2 ng, 20 ng und 200 ng) unter denselben Bedingungen mitanalysiert. Aus der so erstellten Standardkurve ließ sich über den  $C_T$ -Wert (cycle threshold) die in der Probe enthaltenen Ausgangs-DNA-Konzentration ermitteln. Dabei markiert der  $C_T$ -Wert die Zykluszahl bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die Vermehrung noch im exponentiellen Bereich. Über die Standardkurve konnte so ermittelt werden, welcher  $C_T$ -Wert für welche DNA-Konzentration steht (Cardullo et al., 1988, Mülhardt 2009).

Es wurde in der Regel aus Effizienz-Gründen ein Reaktionsansatz für 96 Proben erstellt (siehe Punkt 8.6.1 Ansatz für eine Probe). Davon wurden pro Probe je 23  $\mu$ l in die einzelnen Wells einer THERMO-FAST® 96 PCR DETECTION PLATE (Thermo Scientific) pipettiert und jeweils 2  $\mu$ l der Probe bzw. des Standards hinzugegeben. Anschließend wurde die Platte mit einer optisch klaren Folie (Sarstedt) verschlossen und für zwei bis drei Min. bei 1.100 upm zentrifugiert. Anschließend wurde es mit dem unter Punkt 8.5.2 beschriebenen Temperaturprofil in dem Applied Biosystems™ 7300 RT-PCR System analysiert.

### **3.3.2.2 Quantifizierung der mitochondrialen DNA (mtDNA) und der 4977 bp Deletion der mtDNA (dmtDNA<sup>4977</sup>)**

Bei der RTq – PCR für die mitochondriale DNA handelt es sich um eine Duplex – PCR. Sie dient zum zeitgleichen Nachweis eines Wildtyp- und eines spezifischen Fragments der 4977 bp Deletion der mtDNA. Das Wildtyp-Fragment ist 113 bp groß und wird von einer FAM-markierten Sonde detektiert. Während das spezifische Fragment der dmtDNA<sup>4977</sup> 122 bp groß ist und die Sonde VIC-markiert ist. Diese Methode wurde von Storm et al. veröffentlicht (Storm et al., 2002). Die Verwendung von zweierlei markierten Sonden erlaubt die gleichzeitige Analyse von zwei verschiedenen Fragmenten. Wie schon bei der RTq-PCR der nDNA wurden zusätzlich zu den Proben Standards mitamplifiziert. Bei der Quantifizierung mitochondrialer DNA wurden jeweils 1  $\mu$ l des Wildtyp ( $10^5$ ) sowie des Deletionsstandards ( $10^4$ -1) eingesetzt. Vom  $10^6$ -Wildtypstandard wurden 2  $\mu$ l eingesetzt, ohne Mischung mit einem Deletionsstandard. Mit Hilfe der erstellten Standardkurve wurden wieder die Ausgangs-DNA-Konzentration der einzelnen Proben ermittelt.

Auch hier wurde in der Regel ein Reaktionsansatz für 96 Proben erstellt (siehe Punkt 8.6.2 Ansatz für eine Probe). Der PCR-Ansatz erfolgte genau wie bei der RTq-PCR für die nDNA. Das Temperaturprofil ist unter 8.5.3 zu finden.

### **3.3 Durchführung der Formalinstudie**

Formalin ist eine wässrige Lösung von Formaldehyd (HCHO). Zur Fixierung wurde eine 10 %ige Formalinlösung verwendet, dies entspricht 4 % Formaldehyd.

Eine höhere Konzentration härtet die äußeren Schichten so stark, dass das Eindringen des Formalins verzögert und die Fixierung uneinheitlich wird. Für die Anforderungen in der histologischen Untersuchung von Geweben ist Formalin aufgrund der guten Fixierungseigenschaften (kaum Schrumpfung der Gewebe) das ideale Fixierungsmittel (Stein et al., 1998). Da Formaldehyd ein proteinvertetzendes Fixativ ist (Lang 2006), war vor Beginn dieser Arbeit zu klären, ob die Fixierung der Gewebe mit Formalin Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat. Ferner war zu klären, inwieweit die Länge der Fixierung Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat. Dieser Fragestellung wurde mit einem systematischen Versuchsaufbau nachgegangen.

#### **3.3.1 Studienaufbau und Durchführung**

Für die Studie wurden zwölf Gewebe (jeweils Großhirn- und Kleinhirngewebe) von 6 verstorbenen Personen (3 Männer und 3 Frauen, im Mittel 53 Jahre) untersucht. In der ersten Phase wurden von jedem Gewebe drei 400 mg schwere Würfel pro Inkubationszeit zugeschnitten.

Inkubationszeiten der ersten Phase: - 30 Min.

- 1 Std.
- 12 Std.
- 1 Tag
- 3 Tage
- 1 Woche
- 3 Monate

## Methoden

Die Inkubation erfolgte in 50 ml Röhren (Nerbe) mit 15 ml gepuffertem Formalin (4,5 % Formaldehyd) im Dunkeln und bei Raumtemperatur, da Formalin temperatur- und lichtempfindlich ist.

Nach Ende der Fixierung wurden die Gewebe 12 Stunden fließend gewässert und anschließend bei - 80 °C eingefroren.

Für die zweite Phase der Studie wurden von 4 der 6 Verstorbenen Personen wieder von jedem Gewebe 3x 400 mg schwere Würfel pro Inkubationszeit zugeschnitten.

Inkubationszeiten der ersten Phase: - 2 Std.

- 4 Std.

- 6 Std.

- 8 Std.

- 10 Std.

Die Proben wurden genauso behandelt wie im ersten Teil der Studie.

### **3.3.2 Analyse der formalinfixierten Gewebeproben**

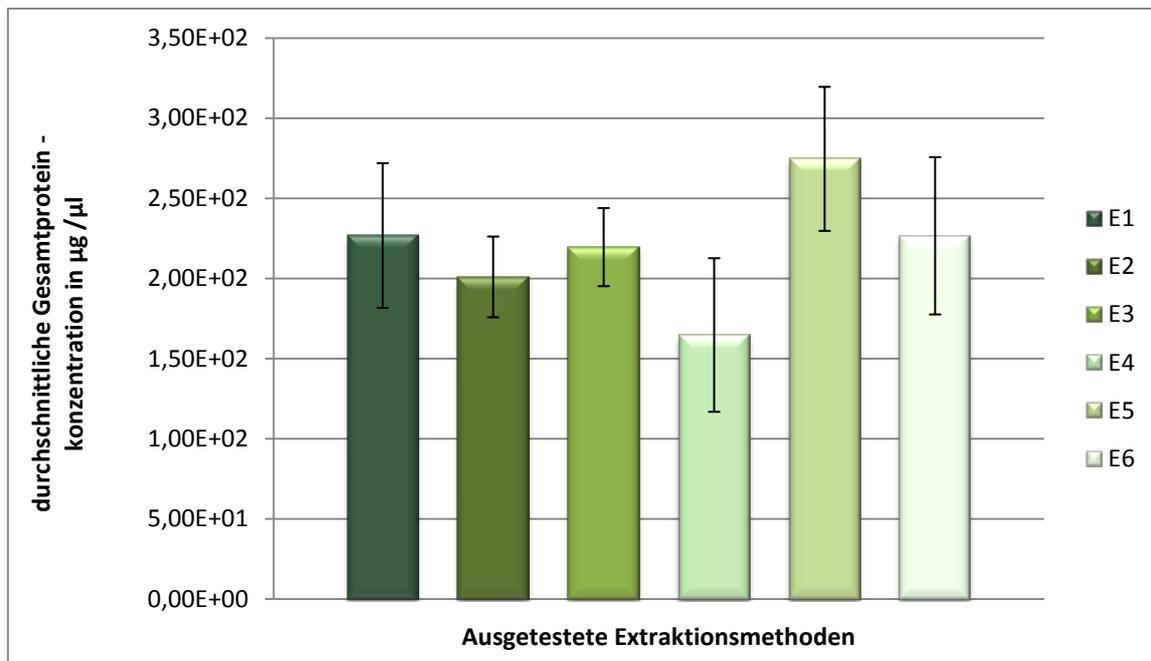
Die Analyse der formalinfixierten und der dazugehörigen frischen (bei - 80 °C eingefroren) Proben erfolgte nach dem unter Punkt 3.1 dargestellten Probenbearbeitungsplan. Zusätzlich wurden die formalinfixierten Proben noch immunhistochemisch untersucht, siehe hierzu 3.2.8.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Methoden Etablierung

#### 4.1.1 Vergleich der Extraktionsmethoden für Frischgewebe

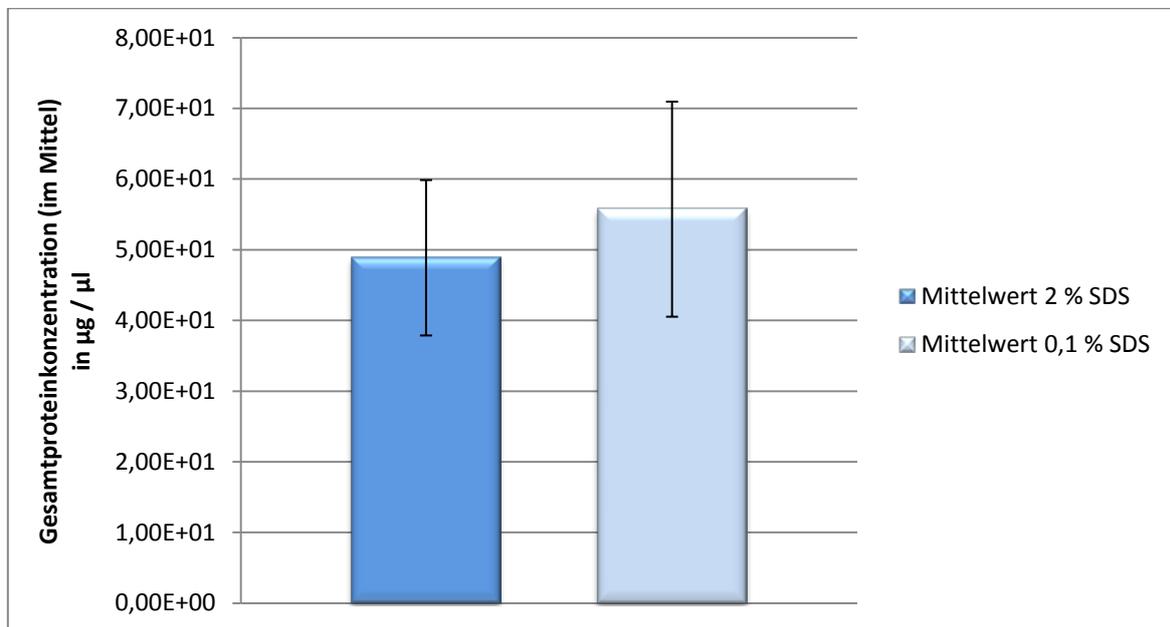
Es wurden sechs verschiedene Methoden zur Extraktion von Proteinen aus Frischgewebe wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben ausgetestet. Die Methode E5 erwies sich mit **274,67**  $\mu\text{g}$  Protein /  $\mu\text{l}$  Extrakt Gesamtprotein im Mittel als effektivste Methode (Abb. 16) und wurde im Weiteren zur Extraktion verwendet. Die minimalste Proteinkonzentration wurde mit Methode E4 (**164,82**  $\mu\text{g}$  Protein /  $\mu\text{l}$  Extrakt) erzielt.



**Abbildung 16: Vergleich der ausgetesteten Extraktionsmethoden.** Angegeben sind die Gesamtproteinmengen in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Extrakt mit der ermittelten Standardabweichung. Die maximale Konzentration wurde mit der Extraktionsmethode E5 (274,67  $\mu\text{g}$  Protein /  $\mu\text{l}$  Extrakt) und die minimale Konzentration an Gesamtprotein mit Methode E4 (164,82  $\mu\text{g}$  Protein /  $\mu\text{l}$  Extrakt) erzielt.

#### 4.1.2 Vergleich der Extraktionsmethoden für Formalingewebe

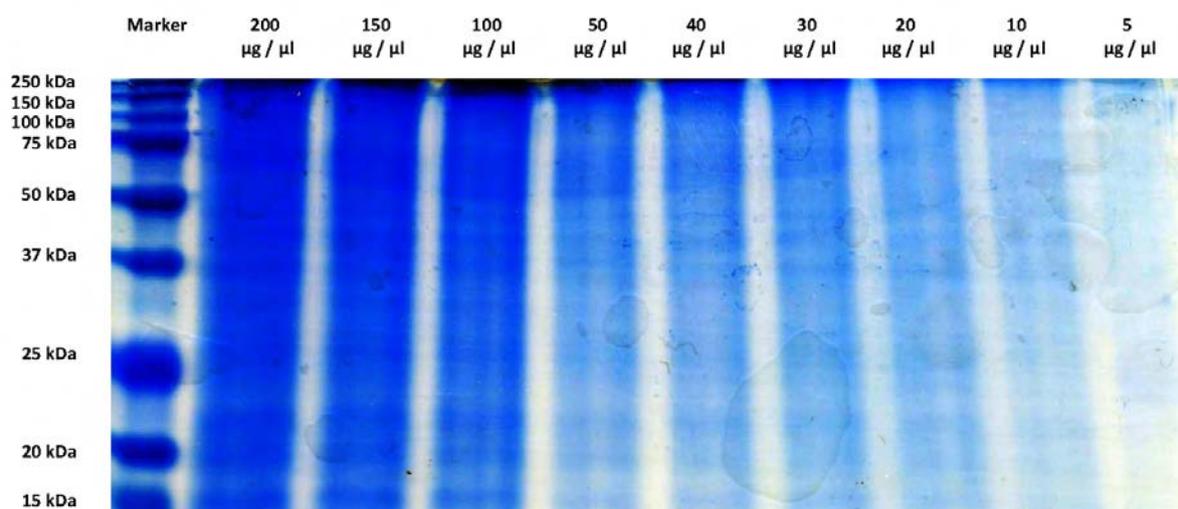
Um die effizienteste Natriumdodecylsulfat-Konzentration (Sodiumdodecylsulfat = SDS) für die Proteinextraktion aus formalinfixiertem Gewebe zu ermitteln, wurden sechs Gewebe mit unterschiedlicher Formalininkubationszeit parallel aufgearbeitet. Dazu wurden zwei Radioimmunoassay-Puffer (RIPA-Puffer) mit verschiedenen SDS-Konzentrationen (0,1 % und 2 %) verwendet. Mit dem RIPA-Puffer mit 0,1 % SDS wurde mit **55,74**  $\mu\text{g}$  Protein /  $\mu\text{l}$  Extrakt Gesamtprotein im Mittel das beste Ergebnis erzielt, während mit 2 % SDS nur **48,87**  $\mu\text{g}$  Protein /  $\mu\text{l}$  Extrakt Gesamtprotein extrahiert werden konnten (Abb 17).



**Abbildung 17: Vergleich von zwei SDS-Konzentrationen im Extraktionspuffer.** Dargestellt sind die Gesamtproteinmengen im Mittel aus sechs Geweben mit unterschiedlicher Formalininkubationszeit. Die Konzentrationen sind in  $\mu\text{g}$  Protein /  $\mu\text{l}$  Extrakt mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Der dunkelblaue Balken zeigt die mittleren Proteinmengen mit 2 % SDS und der hellblaue die mit 0,1 % SDS.

### 4.1.3 Coomassie-Färbungen

Um eine schnelle, effektive und möglichst nur minimal gesundheitsgefährdende Coomassie-Färbung zu etablieren, wurden vier verschiedene Coomassie-Färbemethoden getestet. Dabei zeigte eine modifizierte Färbemethode aus dem Laborjournal von 2003 (3.2.5.3) das beste Ergebnis und fand im Weiteren Verwendung. Bis zu einer Konzentration von **20** µg Protein / µl Extrakt ist ein Nachweis von Proteinen im Coomassie-Gel möglich (Abb. 18).

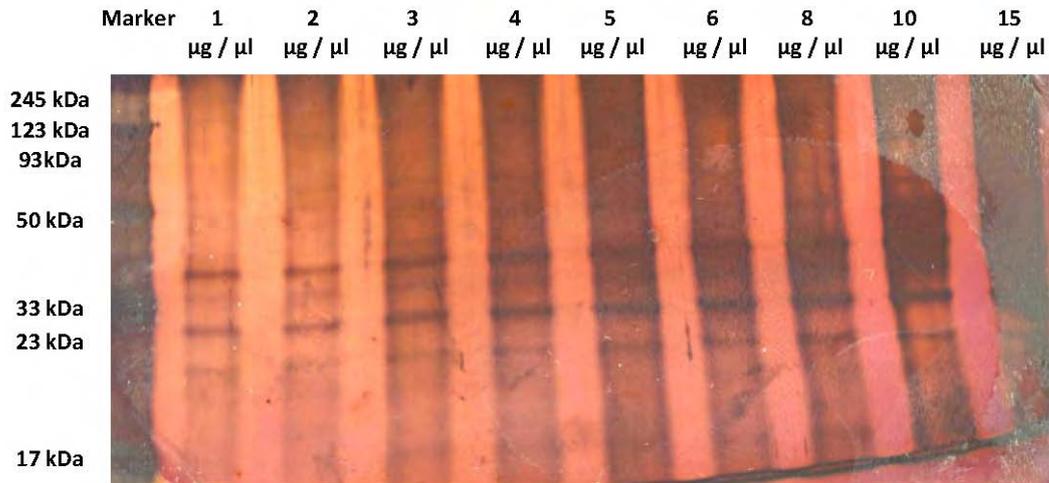


**Abbildung 18: Foto einer Proteinverdünnungsreihe nach Coomassie-Färbung.** Auf das 10 %ige PAGE Trenngel wurden jeweils 5 µl einer Proteinlösung mit den Konzentrationen 200 µg / µl bis 5 µg / µl aufgetragen.

### 4.1.4 Silberfärbung

Damit der Coomassie-Färbung bei einer Proteinkonzentrationen unter **20** µg Protein / µl Extrakt keine eindeutigen Banden mehr detektiert werden konnten, musste eine weitere Färbung etabliert werden. Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung ist die empfindlichste unspezifische Färbemethode. Ihr Vorteil liegt in der hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze: 5 ng Protein/Bande). Verwendet wurde die Anleitung zur Silberfärbung von Blum et al. modifiziert nach Lerch 2001. Da diese Methode sehr gute Ergebnisse lieferte, wurde diese Methode im Weiteren verwendet. Auf die Austestung einer weiteren Silberfärbemethode wurde aus Kostengründen verzichtet (siehe Abb.19). Mit dieser Färbung waren nun Lösungen mit einer Proteinkonzentrationen von **15** µg Protein / µl Extrakt bis **1** µg Protein / µl Extrakt sehr gut nachzuweisen.

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Foto einer Proteinverdünnungsreihe nach Silberfärbung.** Auf das 10 %ige PAGE Trenngel wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  einer Proteinlösung mit den Konzentrationen 1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  bis 15  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  aufgetragen.

### 4.1.5 Etablierung des Western Blots und spezifischer Nachweis von Proteinen

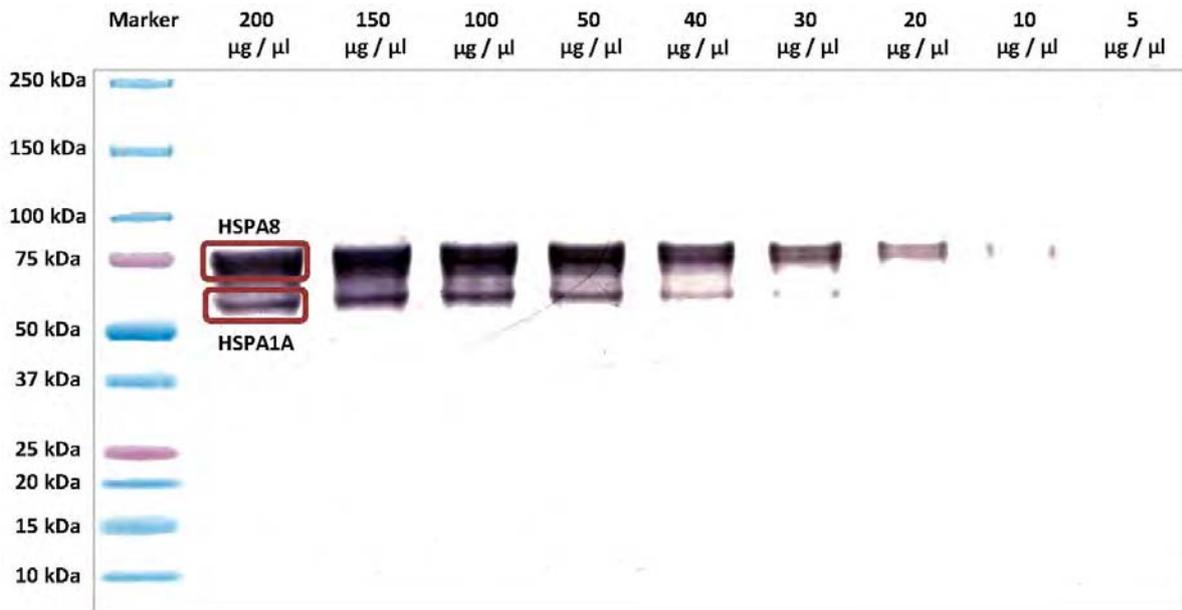
Um ein geeignetes Western-Blot-Protokoll zu etablieren, erfolgte zu Beginn eine ausführliche Literaturrecherche. Während der Etablierung wurden verschiedene Transferzeiten ausgetestet und eine Transferzeit von 90 Min. stellte sich für Proteine von einer Größe von 70 kDa (HSP70-Superfamilie) als am effektivsten heraus. Die anzulegende Spannung war vom Hersteller des Blotgerätes vorgegeben.

Für die Immundetektion wurden die Primärantikörper nach Herstellerangaben mit Blockierlösung 1:1500 verdünnt. Ausgetestet wurden folgende Primärantikörper (STRESSMARQ, USA):

- **Anti HSP70** (Einzelantikörper gegen die induzierte Form)
- **Anti HSC70** (Einzelantikörper gegen die konstitutive Form)
- **Anti HSP70/HSC70** (Kombinationsantikörper gegen die induzierte und konstitutive Form)

Da alle Primärantikörper die gleiche Sensitivität zeigten, wurde im Weiteren aus Zeitersparnis und aufgrund geringerer Kosten nur noch der Kombinationsantikörper verwendet (Abb. 20). Mit diesem Antikörper war HSPA8 (HSC70) bis zu einer Konzentration von 20  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  und HSPA1A (HSP70) bis zu einer Konzentration von 30  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  mit der Membralyzer-Software (Version 2.5.1) noch gut zu analysieren.

## Ergebnisse



**Abbildung 20: Foto einer Proteinverdünnungsreihe nach Western Blot.** Zu sehen ist die Membran nach erfolgter Behandlung mit dem Primärantikörper Anti HSP70/HSC70 und dem Sekundärantikörper (Anti-Maus mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, Promega). Die spezifische Detektion wurde mit Western Blue® (Promega) durchgeführt. Dieses Reagenz enthält die für die Farbreaktion nötigen Substrate BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazodiumchlorid). Die alkalische Phosphatase katalysiert die Umsetzung der Substrate zu einem violetten Farbstoff.

## **4.2 Einfluss der Formalinfixierung auf die Untersuchungsergebnisse und deren Aussagekraft**

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob sich die Gewebe aus der im Institut für Rechtsmedizin zur Verfügung stehenden Gehirngewebebank für die vorgesehenen Analysen eignen. Aus diesem Grund wurden die Gewebe (jeweils Groß- und Kleinhirn) von sechs Verstorbenen mit einem mittleren erreichten Lebensalter von 54 Jahren (3 Männer und 3 Frauen), wie unter Punkt 3.3 aufgeführt, bearbeitet. Im Ganzen wurden in der vorliegenden Arbeit 148 Gewebeproben untersucht.

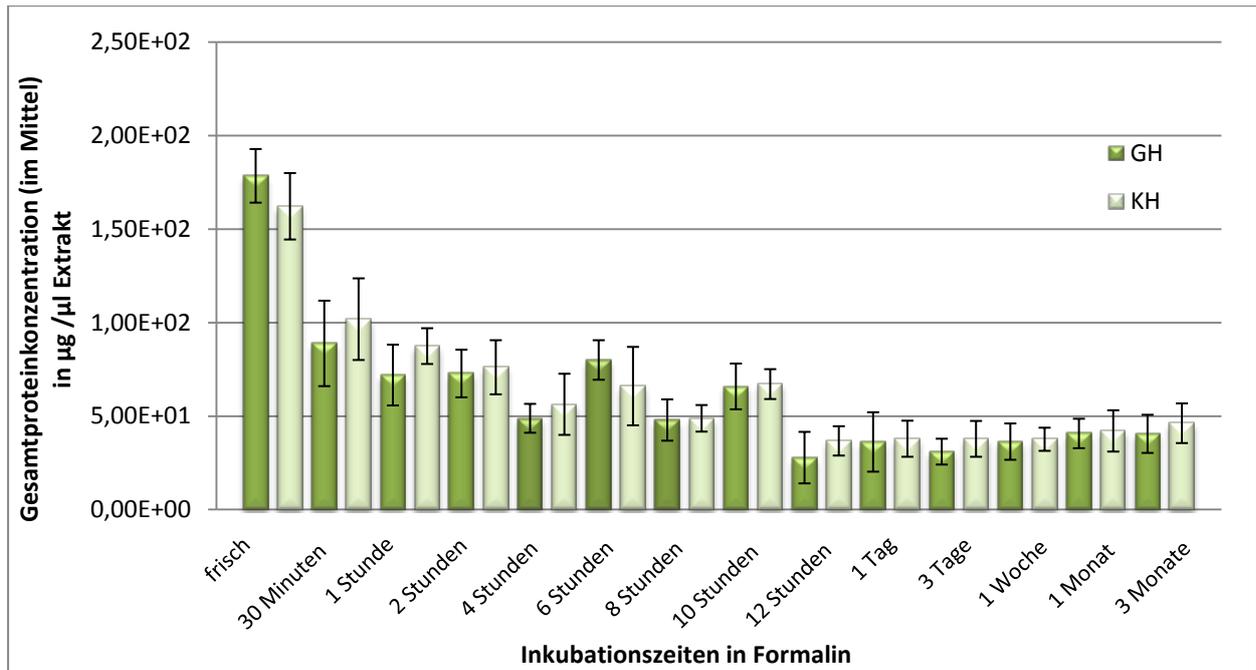
### **4.2.1 Proteinanalysen**

#### **4.2.1.1 Einfluss der Dauer der Formalinfixierung auf die Extraktion und Quantifizierung von Gesamtprotein**

Nach der Behandlung der Proben mit Formalin wurden von jeder Probe 4 unabhängige Proteinextraktionen mit anschließender Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration des Eluats durchgeführt. Dies gelang in allen untersuchten Proben.

Wie in Abbildung 21 illustriert, nimmt die Gesamtproteinmenge proportional zur Inkubationszeit in Formalin ab. Nach 3 Monaten Formalinfixierung kam es zu einer Abnahme der quantifizierbaren Gesamtproteinkonzentration um **77 %** im Großhirn und **72 %** im Kleinhirn. Aufgrund des ermittelten P-Value für das Großhirn von **0,0028** und für das Kleinhirn von **0,0033** kann der Rückgang der Gesamtproteinmenge mit längerer Formalininkubationszeit als Signifikant angesehen werden (Tab.34).

## Ergebnisse



**Abbildung 21: Abhängigkeit der Gesamteproteinkonzentration von der Formalininkubationszeit.** Aufgeführt sind die Mittelwerte aus 4 separaten Extraktionen aller Proben mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Balken der Großhirnergebnisse sind dunkelgrün gefärbt, die des Kleinhirns hellgrün. Die Gesamteproteinmenge nimmt proportional zur Inkubationszeit in Formalin ab. Nach einer Inkubationszeit von 3 Monaten in Formalin kam es im Großhirn zu einer 77 %-igen und im Kleinhirn zu einer 72 %-igen Abnahme an Gesamteprotein im Extrakt.

### 4.2.1.2 Vergleich der Ergebnisse des Western Blots mit dem

#### Nachweis im histologischen Schnitt

Alle Proben wurden sowohl mit Hilfe des Western Blots analysiert, als auch immunhistochemisch untersucht.

Da aber im Western Blot nur bei den gefrorenen, nicht mit Formalin behandelten Proben der Nachweis von HSPA1A und HSPA8 gelang und diese Proben nicht immunhistochemisch untersucht werden konnten, war ein direkter Vergleich nicht möglich.

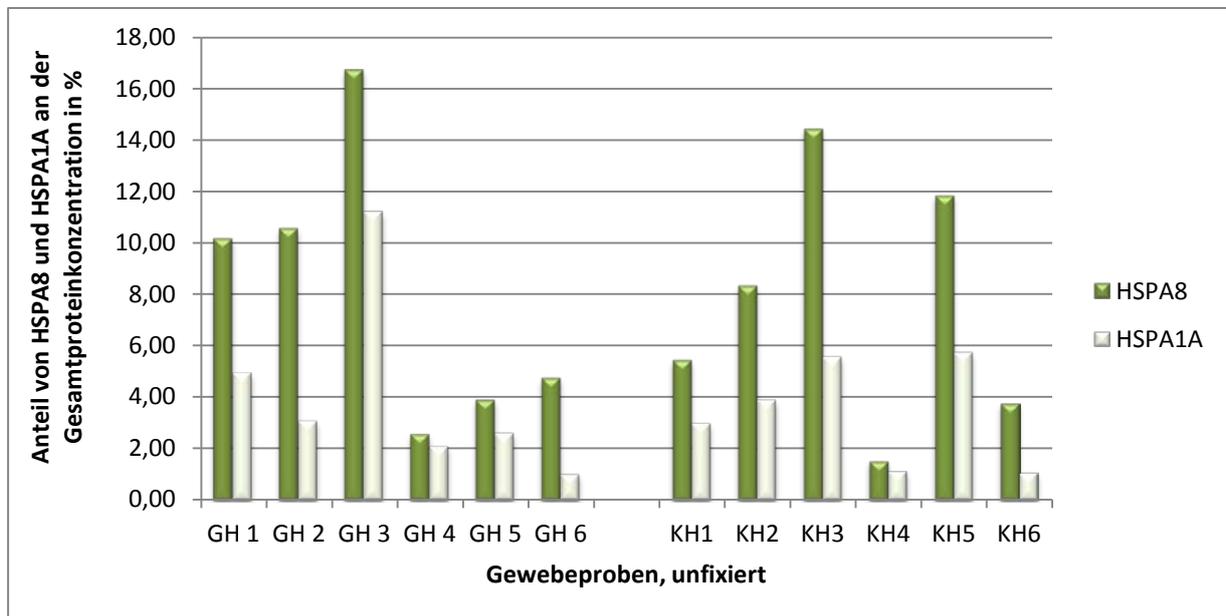
Abbildung 22 verdeutlicht, dass der Anteil von HSPA1A und HSPA8 an der Gesamteproteinkonzentration zwischen den einzelnen Personen und auch in den untersuchten Gehirnbereichen starken Schwankungen unterworfen war.

Die niedrigsten Werte für HSPA8 wurden im **Großhirn** und **Kleinhirn** in Gewebe 4 (**2,59 %** bzw. **1,53 %**) ermittelt. Für HSPA1A wurden in Gewebe 6 sowohl im **Großhirn** als auch im **Kleinhirn** die minimalsten Werte (**1,01 %** bzw. **1,06 %**) gemessen.

Im **Großhirn** und **Kleinhirn** wurde der Maximalwert für HSPA8 in Gewebe 3 (**16,75 %** und **14,4 %**) bestimmt. Die höchsten prozentualen Anteile von HSPA1A am Gesamteprotein

## Ergebnisse

konnte im **Großhirn** in Gewebe 3 (**11,2 %**) und im **Kleinhirn** in Gewebe 5 (**5,73 %**) nachgewiesen werden.

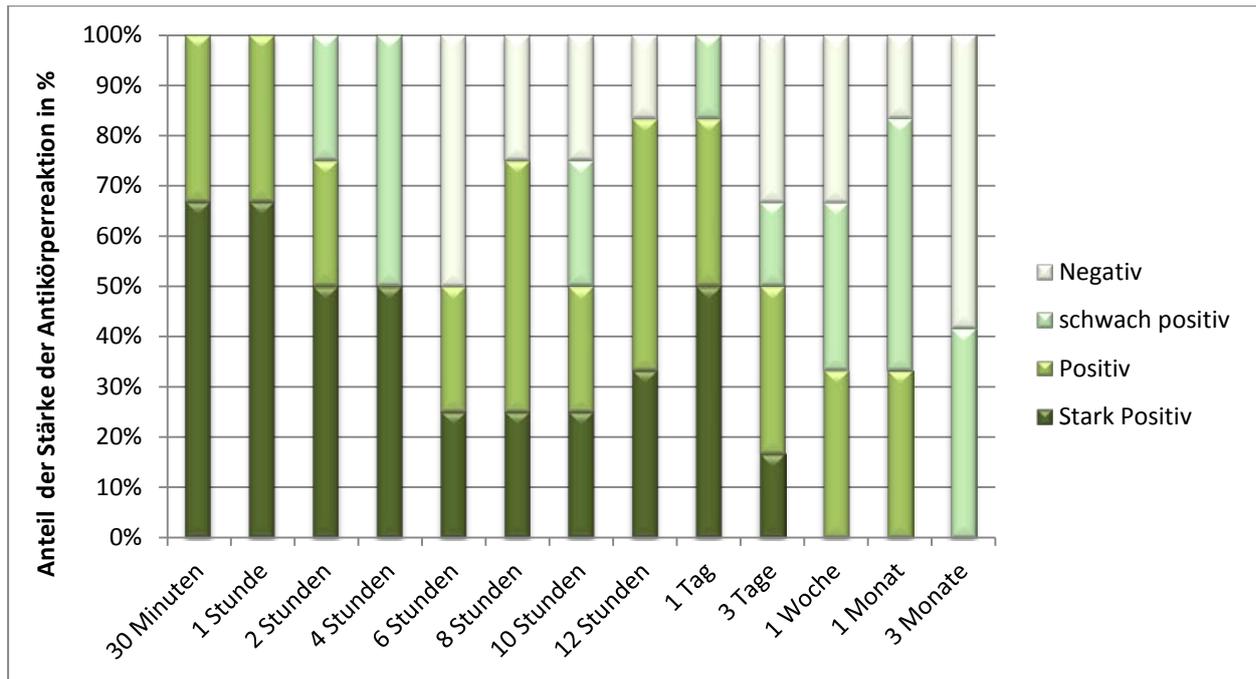


**Abbildung 22: Anteil von HSPA8 und HSPA1A an der Gesamtproteinkonzentration in %.** Angegeben sind die Werte für die unbehandelten Proben. Die Balken für die HSPA8-Ergebnisse sind dunkelgrün gefärbt und die für die HSPA1A-Ergebnisse hellgrün. GH = Großhirn, KH = Kleinhirn.

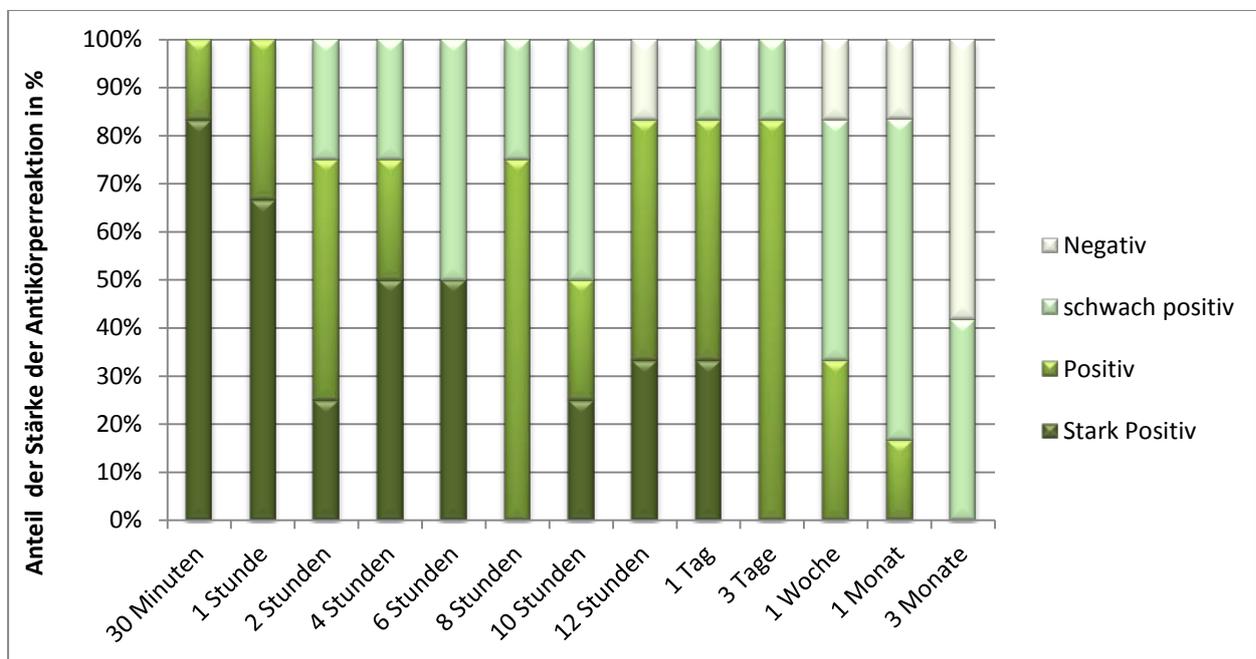
Im histologischen Schnitt war, ähnlich wie bei der Gesamtproteinmenge, zu beobachten, dass die Nachweisbarkeit der Proteine proportional zur Fixierungsdauer abnahm. In Abbildung 23 und 24 ist zu sehen, dass ab einer Woche Formalinfixierung die Proben mit schwach positiven bzw. negativen Proteinnachweis stark zunehmen. Nach 3 Monaten sind in **58,3 %** der Gewebeschnitte sowohl im Großhirngewebe als auch im Kleinhirngewebe keine Proteine mehr nachweisbar. Nach 30 Min. Formalinfixierung reagierten **83,3 %** der untersuchten Kleinhirngewebe und **66,7 %** der Großhirnschnitte nach der immunhistochemischen Behandlung stark positiv.

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen fotografische Aufnahmen der Gewebe unterschiedlicher Formalinfixierungszeiten nach immunhistochemischer Behandlung. Die Aufnahmen wurden mit dem Fotomikroskop Axiophot (Axio Cam HR) und der Axio Vision Rel.4.5 Software der Firma Zeiss mit einem 20-iger Objektiv aufgenommen. Dies entspricht einer 250-fachen Vergrößerung. In den Bildern ist ebenfalls zu sehen, dass die Nachweisbarkeit der Proteine mit zunehmender Fixierung immer schwieriger wird.

## Ergebnisse

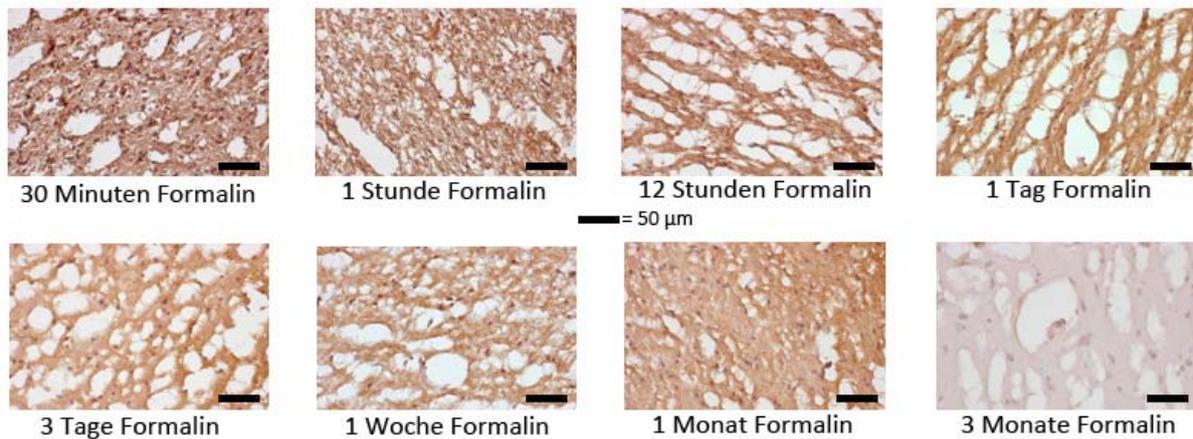


**Abbildung 23: Mittelwerte der visuellen Beurteilung der histologischen Schnitte.** Die Beurteilung erfolgte nach der immunhistochemischen Reaktion. Dargestellt sind die Werte für die Gewebeschnitte aus dem Großhirn. Die Beurteilung erfolgte unabhängig durch 2 Begutachter. Nach 30 Min. Formalinfixierung, reagierten **66,7 %** der Großhirnschnitte nach der immunchemischen Behandlung stark positiv, während nach 3 Monaten **58,3 %** der Gewebeschnitte negativ ausfielen.

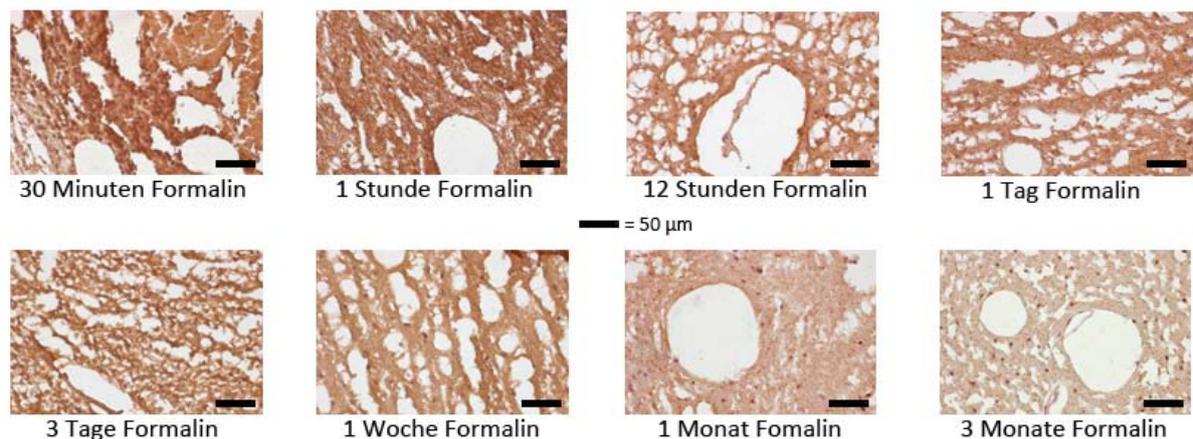


**Abbildung 24: Mittelwerte der visuellen Beurteilung der histologischen Schnitte.** Die Beurteilung erfolgte nach der immunhistochemischen Reaktion. Dargestellt sind die Werte für die Gewebeschnitte aus dem Kleinhirn. Die Beurteilung erfolgte unabhängig durch 2 Begutachter. Nach 30 Min. Formalinfixierung reagierten **83,3 %** der Kleinhirnschnitte, nach der immunchemischen Behandlung stark positiv, während nach 3 Monaten **58,3 %** der Gewebeschnitte negativ ausfielen.

## Ergebnisse



**Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von HSPA8 und HSPA1A in Abhängigkeit von verschiedenen Formalinfixierungszeiten.** Dargestellt sind Gewebeschnitte des Großhirns. Die Gewebe wurden zwischen 30 Min. und 3 Monaten in Formalin fixiert und anschließend immunhistochemisch angefärbt. Alle Fotos wurden mit dem Fotomikroskop Axiophot (Axio Cam HR) und der Axio Vision Rel.4.5 Software der Firma Zeiss (Deutschland) aufgenommen. Es wurde ein 20-iger Objektiv verwendet. Dies entspricht einer 250-fachen Vergrößerung. Darstellt sind die Gewebe mit unterschiedlichen Formalinfixierungszeiten (30 Min. bis 3 Monate) nach immunhistochemischer Reaktion. Die grauen Balken entsprechen 50 µm.



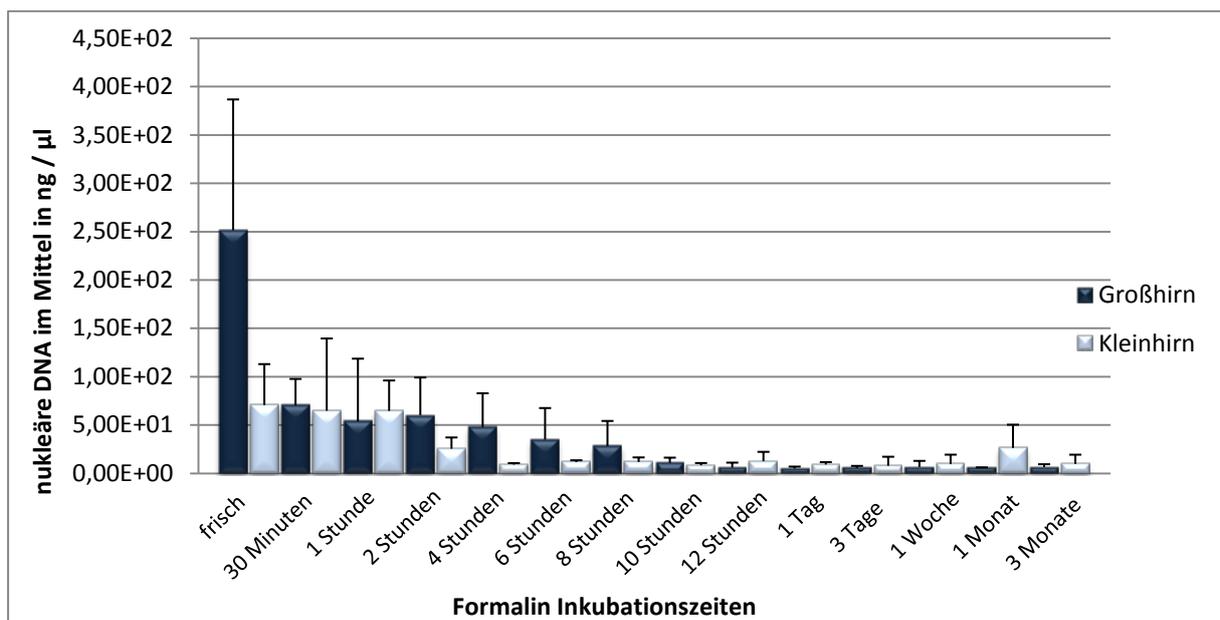
**Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von HSPA8 und HSPA1A in Abhängigkeit von verschiedenen Formalinfixierungszeiten.** Dargestellt sind Gewebeschnitte des Kleinhirns. Die Gewebe wurden zwischen 30 Min. und 3 Monaten in Formalin fixiert und anschließend immunhistochemisch angefärbt. Alle Fotos wurden mit dem Fotomikroskop Axiophot (Axio Cam HR) und der Axio Vision Rel. 4.5 Software der Firma Zeiss (Deutschland) aufgenommen. Es wurde ein 20-iger Objektiv verwendet. Dies entspricht einer 250-fachen Vergrößerung. Darstellt sind die Gewebe mit unterschiedlichen Formalinfixierungszeiten (30 Min. bis 3 Monate) nach immunhistochemischer Reaktion. Die grauen Balken entsprechen 50 µm.

## 4.2.2 DNA-Analysen

Da neben den Stressproteinen auch die nDNA, mtDNA und die 4977 bp Deletion in den Proben untersucht werden sollte, war es auch hier wichtig, zu Beginn den Einfluss von Formalin auf die DNA zu prüfen.

### 4.2.2.1 Auswirkung der Fixierung mit Formalin auf die nukleäre DNA (nDNA)

In 147 der 148 Gewebeproben wurde nDNA nachgewiesen. Wie in Abbildung 27 illustriert, nahm die Konzentration an nDNA in den Proben proportional zur Formalininkubationszeit ab. Nach einer drei monatigen Inkubation der Gewebe in Formalin kam es im **Großhirn** zu einer **97,5** %-igen und im **Kleinhirn** zu einer **86,3** %-igen Abnahme der nDNA-Konzentration im Eluat. Der Rückgang an nDNA in Zusammenhang mit der Formalinfixierung ist als **hoch signifikant** zu werten. Dafür spricht der P-Value von **0,0008** für das **Großhirn** und **0,0003** für das **Kleinhirn** (Tab.35 und 36).



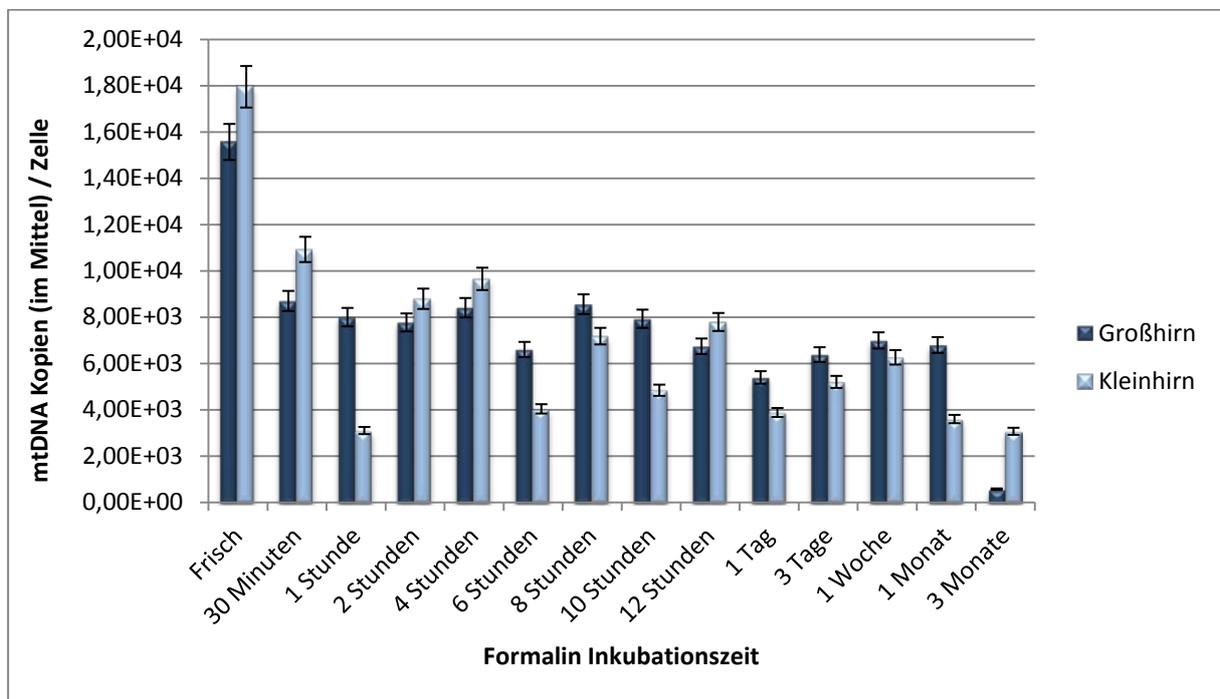
**Abbildung 27: Abhängigkeit der nDNA-Konzentration von der Formalininkubationszeit.**

Aufgeführt sind die Mittelwerte aus einer dreifach Bestimmung mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Balken für die Großhirnergebnisse sind dunkelblau gefärbt, die des Kleinhirns hellblau. Die nDNA-Konzentration nimmt proportional zur Inkubationszeit in Formalin ab. Nach einer Inkubationszeit von 3 Monaten in Formalin kam es im Großhirn zu einer 97,5 %-igen und im Kleinhirn zu einer 86,3 %-igen Abnahme an nDNA im Extrakt.

#### 4.2.2.2 Auswirkung der Formalinfixierung auf die mitochondriale DNA und den Nachweis der mitochondrialen 4977 bp Deletion

Bei der quantitativen Bestimmung der mtDNA wurden in 142 Proben und beim Nachweis der mitochondrialen 4977bp Deletion in 118 der DNA-Extrakte Ergebnisse erzielt (Tab. 37 und 38).

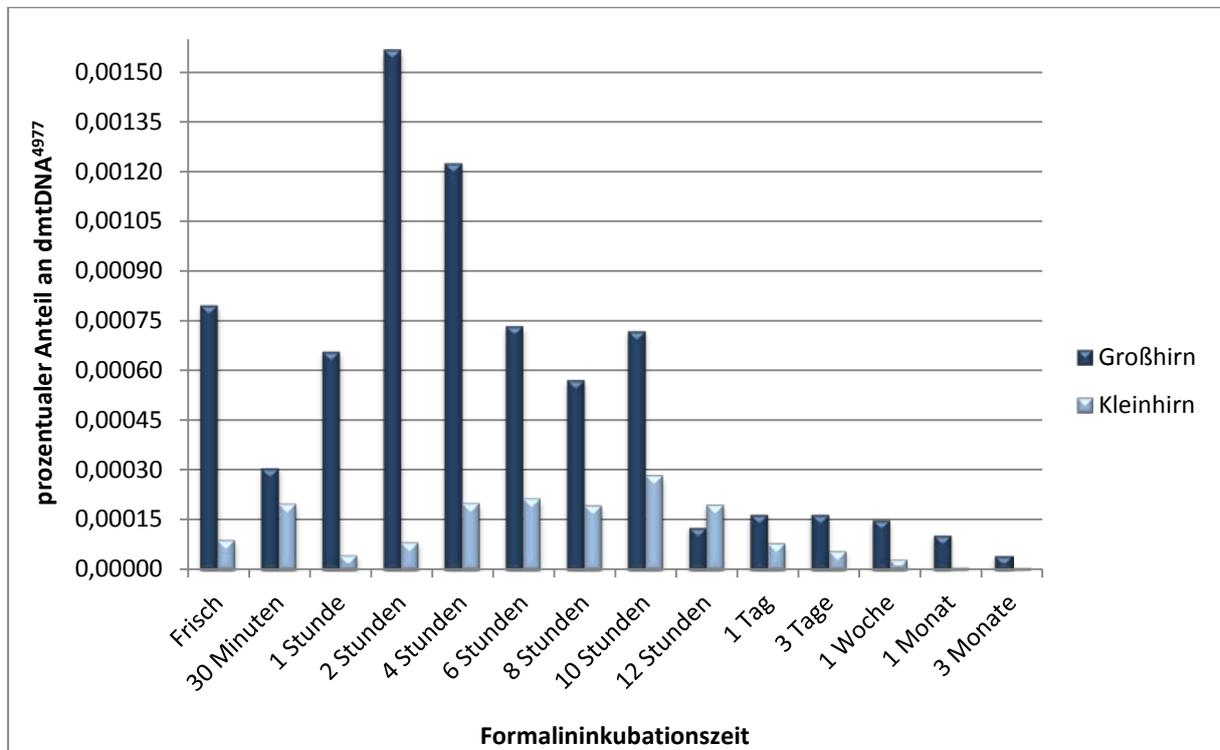
Der Einfluss von Formalin auf den Nachweis der mtDNA ist in Abbildung 28 dargestellt. Der Rückgang an mtDNA Kopien / Zelle in Zusammenhang mit der Formalinfixierung ist mit einem P- Value von **0,0149** für beide Gewebe als **signifikant** zu werten.



**Abbildung 28: Abhängigkeit der mtDNA-Kopien pro Zelle von der Formalininkubationszeit.** Aufgeführt sind die Mittelwerte aus einer dreifach Bestimmung mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Balken für die Großhirnergebnisse sind dunkelblau gefärbt, die des Kleinhirns hellblau. Die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle nimmt mit zunehmender Inkubationszeit deutlich ab.

## Ergebnisse

Auch der Nachweis der dmtDNA<sup>4977</sup> wird nachhaltig durch die Fixierung mit Formalin beeinflusst (Abb. 29). Obwohl die Werte für die einzelnen Inkubationszeiten stark schwanken, ist in beiden Geweben zu sehen, dass ab einer Fixierungsdauer von 12 Stunden, dies entspricht einer kompletten Fixierung des Gewebes, der prozentuale Anteil der dmtDNA<sup>4977</sup> stark abnimmt und nach drei Monaten keine aussagekräftigen Werte nachweisbar sind. Für die dmtDNA<sup>4977</sup> im **Großhirngewebe** wurde ein **Rückgang** mit einem P-Value von **0,0001** ermittelt (Tab. 39 und 40). Dies ist als **hoch signifikant** zu werten. Der **Rückgang** des prozentualen Anteils der dmtDNA<sup>4977</sup> im **Kleinhirngewebe** ist mit einem P-Value von **7,3765 x 10<sup>-6</sup>** ebenfalls als **hoch signifikant** zu werten.



**Abbildung 29: Abhängigkeit des prozentualen Anteils an dmtDNA4977 von der Formalininkubationszeit.** Aufgeführt sind die Mittelwerte aus einer dreifach Bestimmung. Die Balken für die Großhirnergebnisse sind dunkelblau gefärbt, die des Kleinhirns hellblau. Es zeigt sich, dass der prozentuale Anteil an dmtDNA4977 mit zunehmender Inkubationszeit deutlich abnimmt.

### 4.3 Ergebnisse der forensischen Proben

In dieser Arbeit wurde Gehirngewebe von 100 Verstorbenen (64 Männer und 36 Frauen), mittleres Lebensalter 57 Jahre und einer mittleren postmortalen Liegezeit von 3 Tagen untersucht. Es wurden jeweils Gewebeproben des Rinden- und Mark-Bereiches aus dem Großhirn und Kleinhirn analysiert, so dass insgesamt 400 Gewebeproben untersucht wurden.

#### 4.3.1 Untersuchung der nukleären DNA (nDNA)

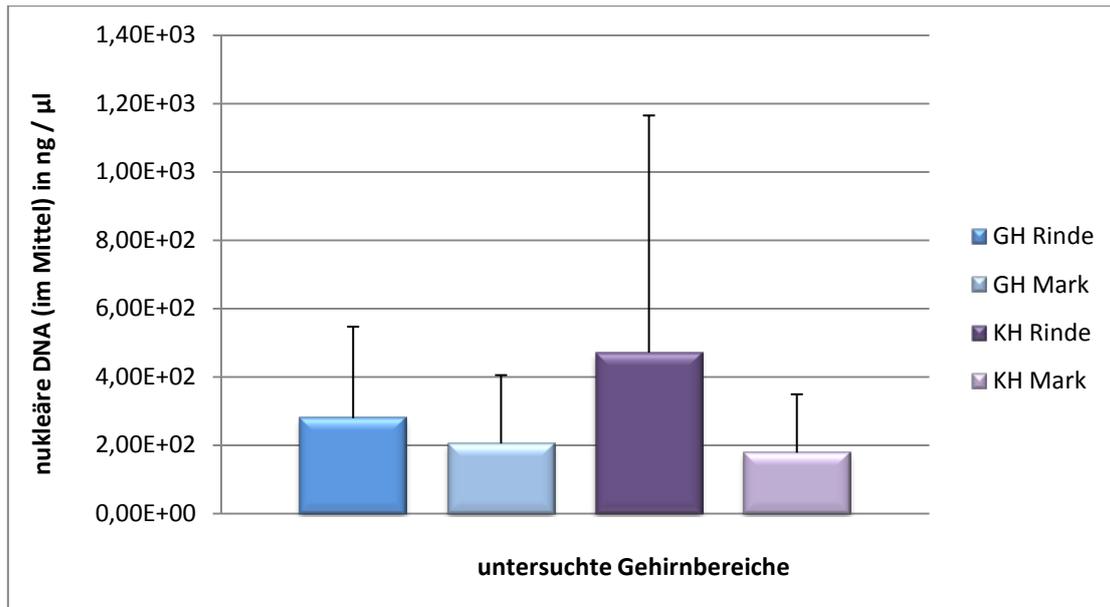
Die Quantifizierung der nDNA erfolgte mit der unter 3.3.2.1 beschriebenen Methode. In allen untersuchten Proben aus dem Markbereich des Kleinhirns wurde nukleäre DNA isoliert. Bei neun Proben (sechs Großhirn, zwei Kleinhirn) aus dem Rindenbereich und einer Probe aus dem Markbereich des Großhirns konnte dagegen keine nDNA nachgewiesen werden. Diese zehn Proben wurden bei der Beurteilung aller DNA-Analyse-Ergebnisse nicht berücksichtigt.

##### 4.3.1.1 Vergleich des Rinden- und Markbereiches im Großhirn und Kleinhirn

In der Großhirnrinde wurde im Mittel eine nDNA-Konzentration von **279** ng / µl Extrakt und in der Kleinhirnrinde von **471** ng / µl Extrakt nachgewiesen (Tab. 14 und 15). Dies entspricht unter der Annahme, dass sich in einer diploiden Zelle 6,6 pg nukleäre DNA befinden, einer mittleren Zellzahl von **464.183** Zellen in der Großhirnrinde und **784.426** Zellen im Mittel in der Kleinhirnrinde. Für den Mark-Bereich im Großhirn wurde im Mittel eine DNA-Konzentration von **205** ng / µl und für das Kleinhirn **178** ng / µl Extrakt ermittelt ( Tab. 16 und 17). Dies entspricht im Großhirn einer mittleren Zellzahl von **342.402** bzw. im Kleinhirn von **297.260** Zellen / µl Extrakt (Abb. 30).

Es zeigten sich zwischen den verschiedenen Gehirnbereichen keine signifikanten Unterschiede in der nDNA-Konzentration. Alle ermittelten P-Value-Werte sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

## Ergebnisse



**Abbildung 30: Vergleich der nDNA-Konzentration im Rinden- und Mark-Bereich des Groß- und Kleinhirns.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. GH = Großhirn, KH = Kleinhirn. Der Vergleich der Ergebnisse aus der Markregion des Groß- und Kleinhirns mit den Ergebnissen aus dem Rindenbereich weist keinen signifikanten Unterschied auf.

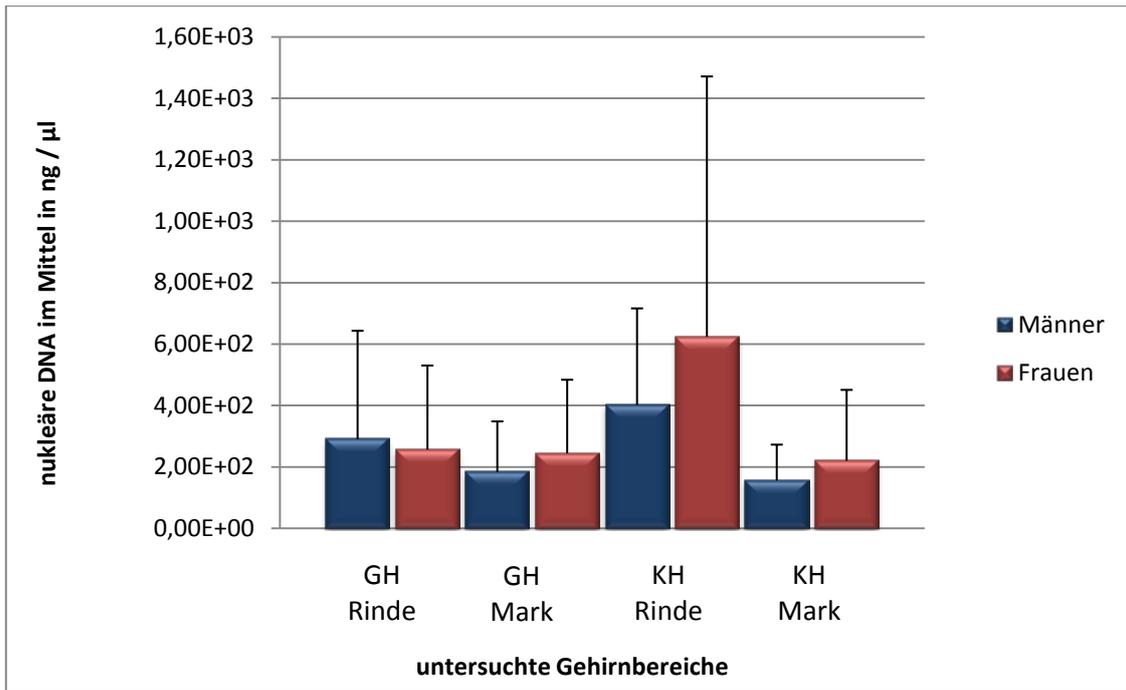
### 4.3.1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Der Vergleich der nDNA-Konzentrationen männlicher und weiblicher Verstorbener zeigte sowohl im Rinden- und Mark-Bereich des Großhirns als auch des Kleinhirns **keinen signifikanten Unterschied** (Abb. 31).

In den Proben männlicher Verstorbener konnten im **Rinden-Bereich des Großhirns** im Mittel **290** ng nDNA / µl Extrakt und im **Kleinhirn** **402** ng nDNA / µl Extrakt detektiert werden. Für die Messungen bei den weiblichen Verstorbenen ergab sich eine mittlere DNA-Konzentration von **256** ng / µl in der **Großhirnrinde** und **624** ng / µl in der **Kleinhirnrinde**.

Für den **Markbereich des Großhirns** wurden bei den männlichen Verstorbenen im Mittel eine DNA-Konzentration von **183** ng / µl Extrakt und für Markbereichs des **Kleinhirns** **156** ng / µl Extrakt gemessen. Bei den weiblichen Verstorbenen ergab sich eine mittlere DNA-Konzentration von **243** ng / µl im **Mark des Großhirns** und **220** ng / µl im **Kleinhirn**.

## Ergebnisse

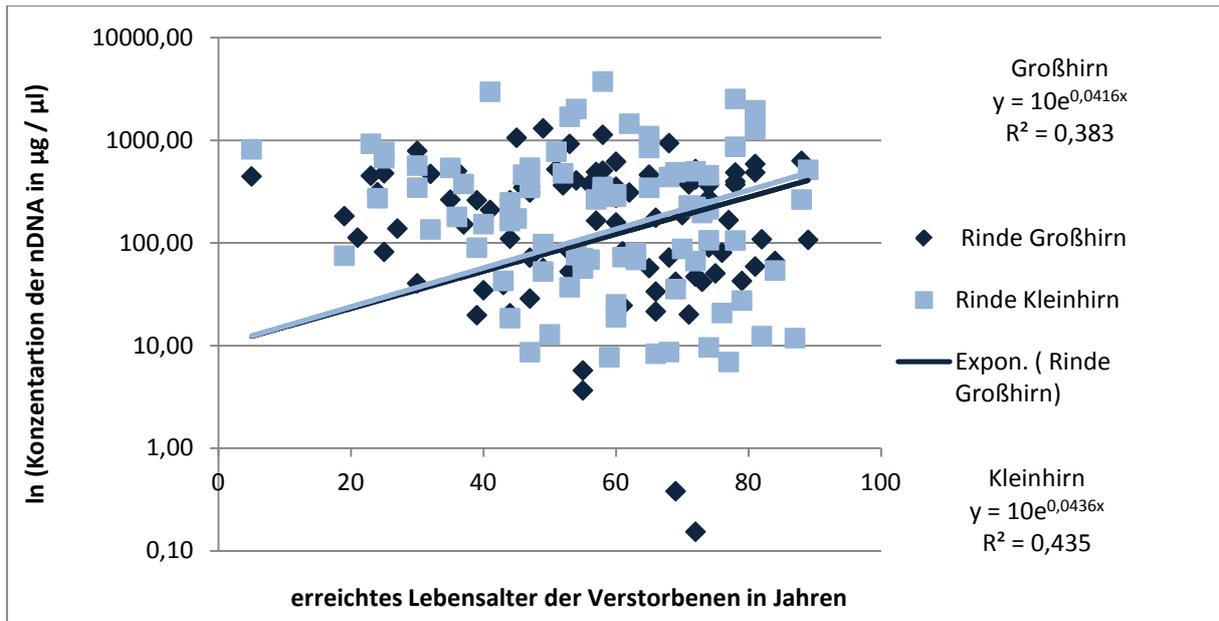


**Abbildung 31: Geschlechtsspezifischer Vergleich der nDNA-Konzentration im Rinden- und Mark-Bereich des Groß- und Kleinhirns.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. GH = Großhirn, KH = Kleinhirn. Der Vergleich der nukleären DNA beider Gruppen (Frauen / Männer) ist nicht signifikant und zeigt einen P-Value von 0,5819 (GH) / 0,2062 (KH) für die Rindenbereiche und 0,3261 (GH) / 0,2565 (KH) für die Markbereiche.

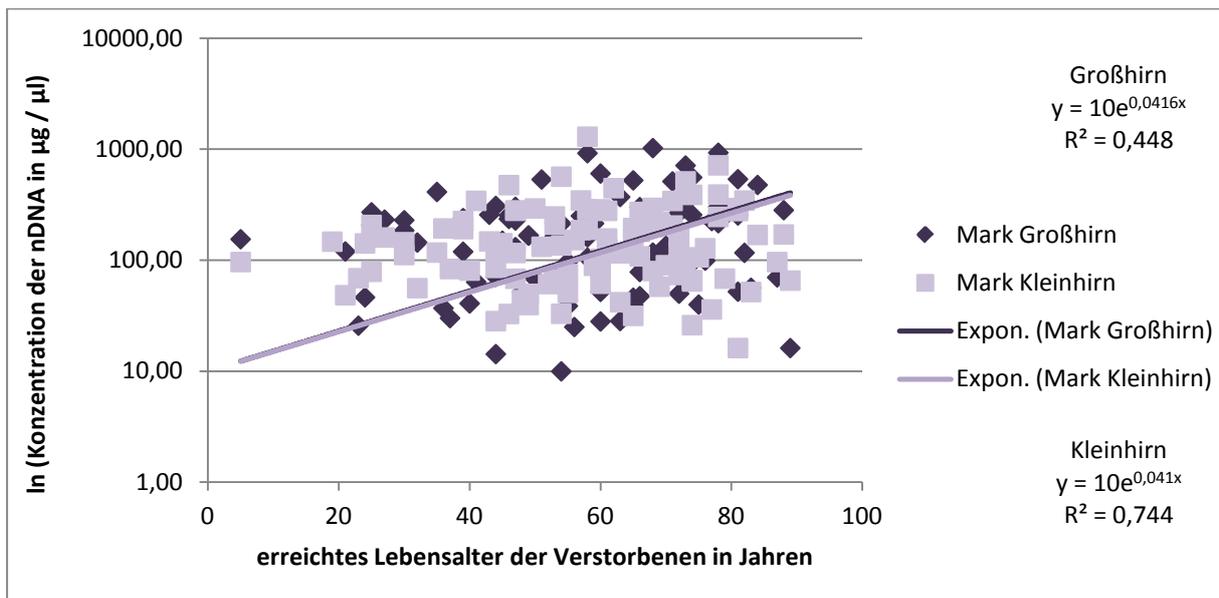
### 4.3.1.3 Altersbedingte Unterschiede

Im Gewebe der Großhirn- und Kleinhirnrinde zeigt sich bei der Einzelauswertung aller Proben ein **hoch signifikanter Zuwachs** (Abb. 32 und 33) an nDNA im Alter (P-Value  $3,7513 \times 10^{-9}$  (GH) /  $7,9314 \times 10^{-5}$  (KH)). Auch in den Mark-Bereichen des Großhirns und Kleinhirns zeigte sich ein Zuwachs der nDNA mit zunehmendem Alter, der als **hoch signifikant** zu werten ist (P-Value  $1,3834 \times 10^{-13}$  (GH) /  $1,6791 \times 10^{-15}$  (KH)).

## Ergebnisse



**Abbildung 32: Vergleich der nukleären DNA-Konzentration mit dem erreichten Lebensalter.** Es wurden die Einzelkonzentrationen in  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  der Groß- und Kleinhirnrinde gegen das erreichte Lebensalter der Verstorbenen aufgetragen.



**Abbildung 33: Vergleich der nukleären DNA-Konzentration mit dem erreichten Lebensalter.** Es wurden die Einzelkonzentrationen in  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  des Groß- und Kleinhirnmarks gegen das erreichte Lebensalter der Verstorbenen aufgetragen.

### 4.3.2 Quantifizierung mitochondrialer DNA

Die Analyse der mtDNA erfolgte mit der unter 3.3.2.2 beschriebenen Methode. In allen untersuchten Proben mit Ausnahme einer Probe aus dem Kleinhirnrindebereich (G011, weiblich, 39 Jahre) wurde mitochondriale DNA nachgewiesen.

Alle Werte unter 1.00.000 Kopien mtDNA / Extrakt mit einem prozentualen Wert  $\leq 0,0001$  für die 4977bp Deletion der mtDNA wurden aus der Wertung ausgenommen. Damit ist gewährleistet, dass falsch-negative Ergebnisse in die Auswertung einfließen. Da eine Anzahl von weniger als 1.000.000 Kopien nicht ausreicht um eine Deletion mit einem prozentualen Wert von 0,0001 % zu detektieren.

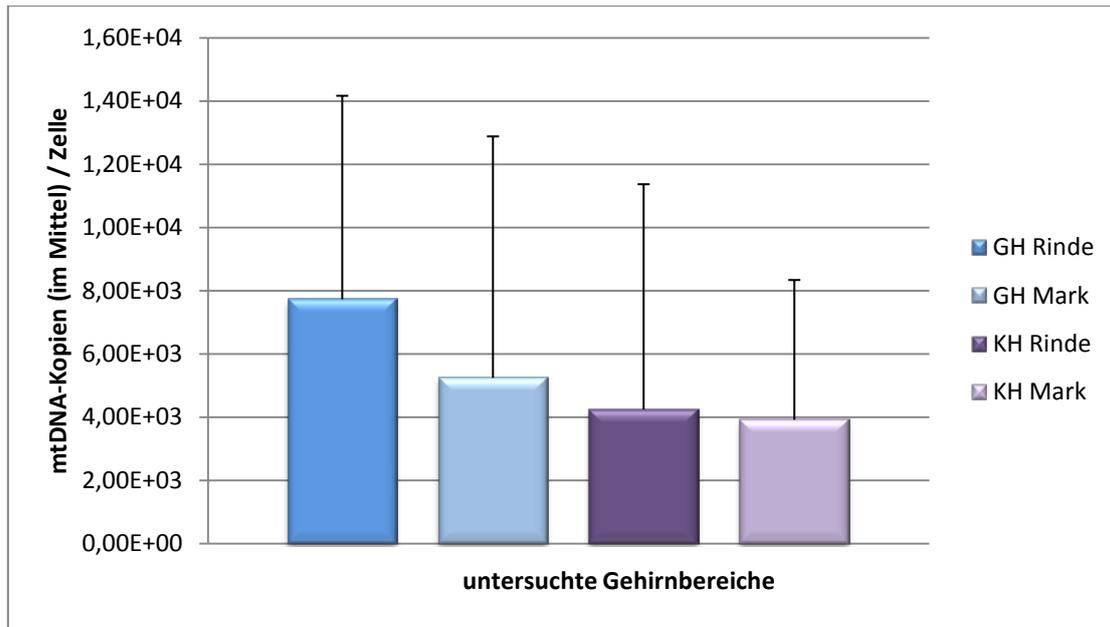
#### 4.3.2.1 Vergleich des Rinden- und Markbereiches in Großhirn und Kleinhirn

In der **Rinde** des **Großhirns** wurden im Mittel **35.148.748** Kopien mtDNA /  $\mu\text{l}$  Extrakt detektiert. Dies entspricht einer mittleren mtDNA-Kopienzahl **7735** / Zelle. Im **Kleinhirn** waren es im Mittel **12.818.091** Kopien mtDNA /  $\mu\text{l}$  Extrakt. Dies entspricht mittleren mtDNA-Kopienzahl **4245** Kopien mtDNA pro Zelle (Tab.).

Im **Mark des Großhirns** konnten im Mittel **11.225.514** und im **Kleinhirn** **7.612.834** Kopien mtDNA pro  $\mu\text{l}$  Extrakt nachgewiesen werden. Dies entspricht **5246** bzw. **3919** Kopien mtDNA in einer einzelnen Zelle (Abb.34).

Es zeigen sich zwischen dem Rinden- und dem Markbereich des Groß- und Kleinhirns Unterschiede, die als **hoch signifikant bzw. marginal signifikant** zu werten sind. Zwischen der Rinde des Groß- und Kleinhirns sind die ermittelten Unterschiede als **hoch signifikant** zu werten (P-Value:  **$2,38 \times 10^{-8}$** ). Für den Mark-Bereich im Groß- und Kleinhirn lässt sich an Hand des P-Value von **0,56 keine Signifikanz** ermitteln.

## Ergebnisse



**Abbildung 34: Vergleich der Anzahl an mtDNA-Kopien / Zelle im Rinden und Mark-Bereich des Groß- und Kleinhirns.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung GH = Großhirn, KH = Kleinhirn. In der Rinde des Großhirns konnten im Mittel 7735 Kopien mtDNA / Zelle und in der Rinde des Kleinhirns 4148 Kopien mtDNA pro Zelle nachgewiesen werden. Im Mark des Großhirns und des Kleinhirns konnten im Mittel 5246 bzw. 3919 Kopien mtDNA pro Zelle ermittelt werden.

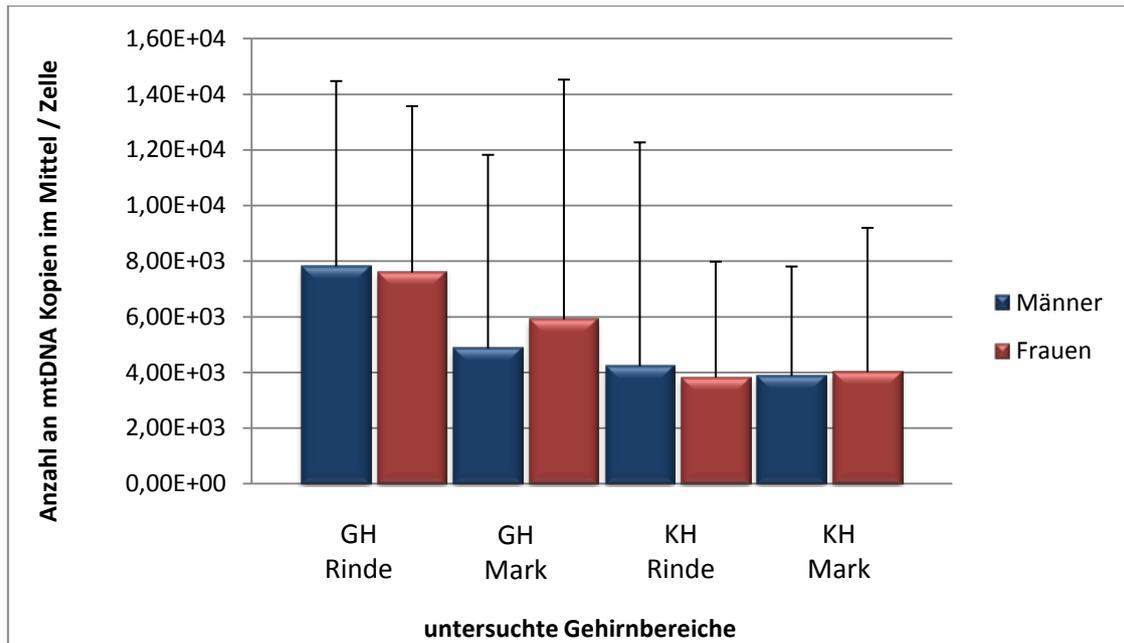
### 4.3.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Bei männlichen Verstorbenen wurde eine mittlere Kopienzahl von **33.693.649** Kopien mtDNA pro  $\mu\text{l}$  Extrakt in der **Großhirnrinde** und **11.423.570** Kopien in der **Kleinhirnrinde** detektiert. Bei weiblichen Verstorbenen wurden **37.877.058** Kopien /  $\mu\text{l}$  in der Rinde des Großhirns und **14.893.176** Kopien /  $\mu\text{l}$  im **Kleinhirn** gemessen. Dies bedeutet bei männlichen Verstorbenen in der Rinde des **Großhirns** **7812** Kopien / Zelle bzw. im **Kleinhirn** **4223** Kopien / Zelle. Bei weiblichen Verstorbenen konnten in der **Großhirnrinde** **7591** Kopien / Zelle und im **Kleinhirn** **3821** Kopien / Zelle im Mittel nachgewiesen werden (Abb.31).

Im **Mark** des **Großhirns** konnten bei den männlichen Verstorbenen im Mittel **9.524.650** und **7.003.016** Kopien mtDNA pro  $\mu\text{l}$  Extrakt im **Kleinhirn** nachgewiesen werden. Dies entspricht **4856** bzw. **3872** Kopien mtDNA pro Zelle. Im **Großhirn** weiblicher Verstorbener waren **13.905.365** und im **Kleinhirn** **8.727.929** Kopien mtDNA pro  $\mu\text{l}$  Extrakt nachzuweisen. Dies entspricht **5907** bzw. **4006** Kopien mtDNA pro Zelle.

Der Vergleich der Kopien mtDNA pro Zelle männlicher und weiblicher Verstorbener zeigte sowohl im Rinden- und Mark-Bereich des Großhirn, als auch des Kleinhirns **keinen signifikanten Unterschied** (Abb. 35).

## Ergebnisse

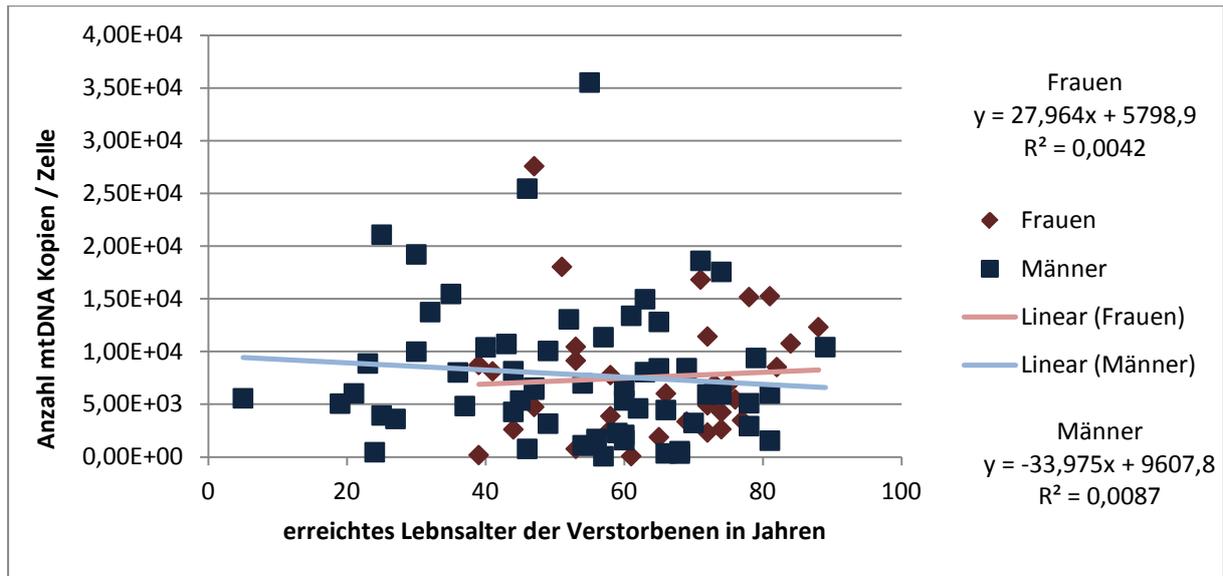


**Abbildung 35: Geschlechtsspezifischer Vergleich des Rinden- und Mark-Bereichs im Groß- und Kleinhirn.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. GH = Großhirn, KH = Kleinhirn. Der Vergleich der mtDNA / Zelle beider Geschlechter miteinander ist nicht signifikant und zeigt einen P-Value von 1 (GH) / 0,88 (KH) für die Rindenbereiche und 0,98 (GH) / 0,98 (KH) für die Markbereiche.

### 4.3.2.3 Altersbedingte Unterschiede

Die Prüfung der vorliegenden Parameter, bezogen auf das Geschlecht und das Alter der Verstorbenen ergab bei Extrapolation einer Trendlinie durch alle Messergebnisse für die Kopienzahl der mtDNA in der **Großhirnrinde** der männlichen Verstorbenen (Abb. 36) einen **marginalen, nicht signifikanten Rückgang** der Kopien mit steigendem erreichten Lebensalter. Für die weiblichen Verstorbenen ergab sich ein **marginaler, nicht signifikanter Anstieg** der Kopien mit steigendem erreichten Lebensalter ( $R^2= 0,0042$  (♀) /  $R^2=0,0087$  (♂)).

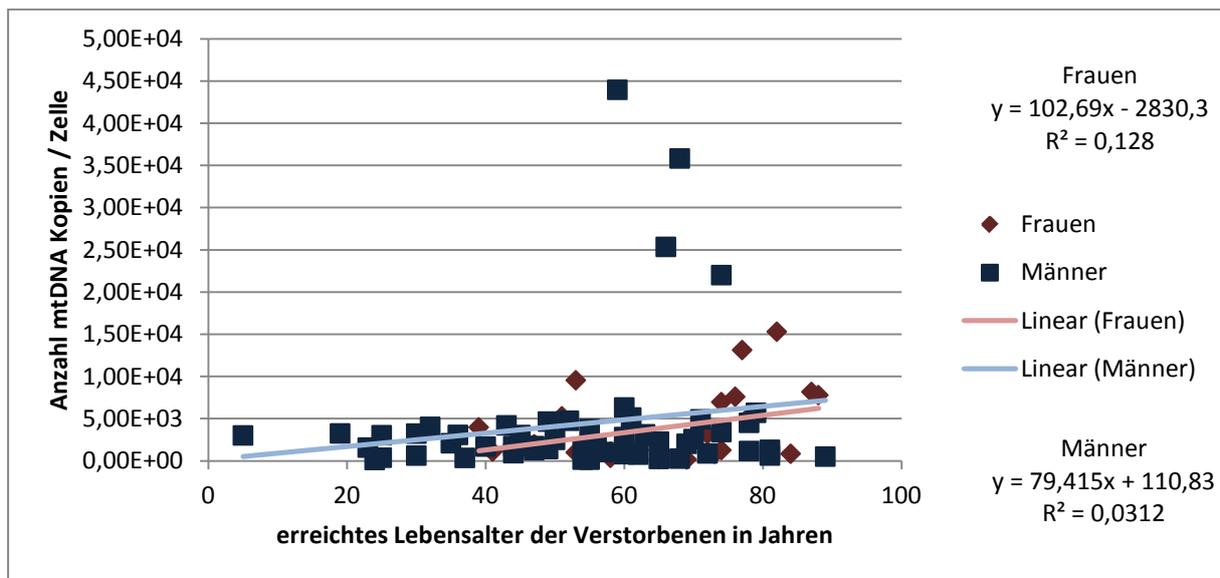
## Ergebnisse



**Abbildung 36: Abhängigkeit der mtDNA-Kopien in der Großhirnrinde zum Lebensalter.** Bei Extrapolation einer durchschneidenden Trendlinie zeigt sich für die Kopienanzahl der mtDNA in der Großhirnrinde der männlichen Verstorbenen ein marginaler, nicht signifikanter Rückgang der Kopien und für die weiblichen Verstorbenen ergab sich ein marginaler, nicht signifikanter Anstieg der Kopien mit steigendem erreichtem Lebensalter ( $R^2 = 0,0042$  (♀) /  $R^2 = 0,0087$  (♂)).

## Ergebnisse

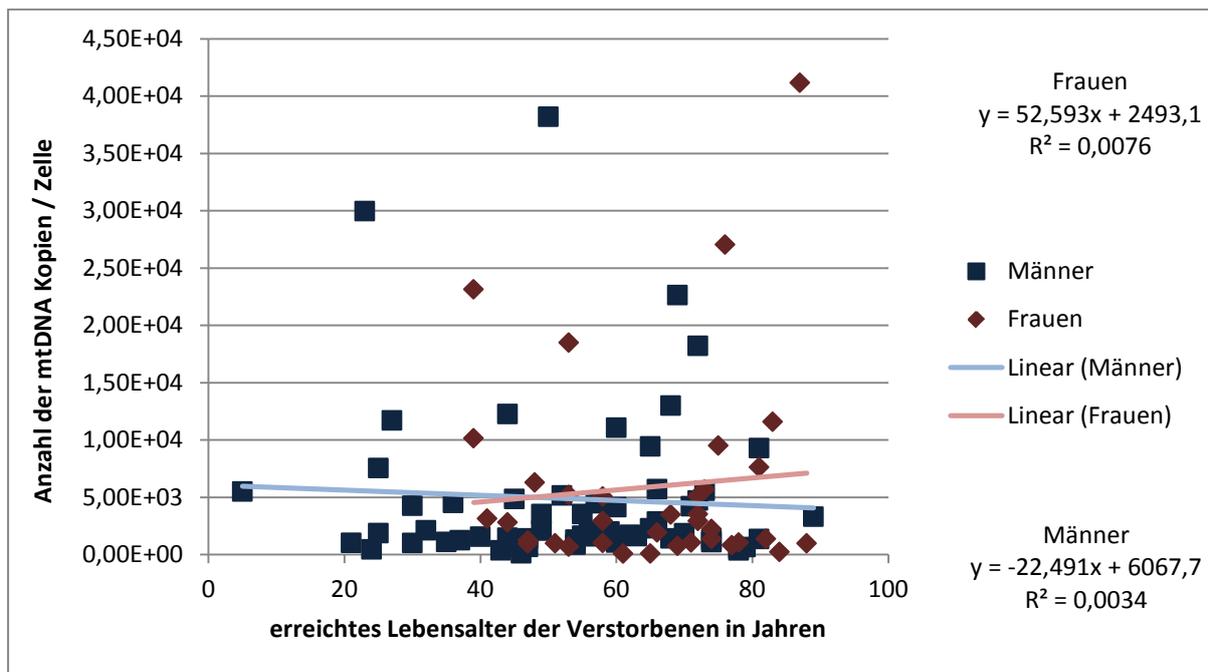
Bei Prüfung der Ergebnisse, bezogen auf das Geschlecht und das Alter der Verstorbenen, ergab sich bei Extrapolation einer Trendlinie durch alle Messergebnisse für die Kopienzahl der mtDNA / Zelle in der Kleinhirnrinde (Abb.37) ein **nicht signifikanter Anstieg** der Kopien mit steigendem erreichten Lebensalter für beide Geschlechter ( $R^2 = 0,128$  (♀) /  $R^2 = 0,0312$  (♂)).



**Abbildung 37: Abhängigkeit der mtDNA-Kopien in der Kleinhirnrinde zum Lebensalter.** Der Vergleich der mtDNA / Zelle beider Geschlechter miteinander zeigt einen nicht signifikanten Anstieg der Kopien mit steigendem erreichten Lebensalter ( $R^2 = 0,128$  (♀) /  $R^2 = 0,0312$  (♂)).

## Ergebnisse

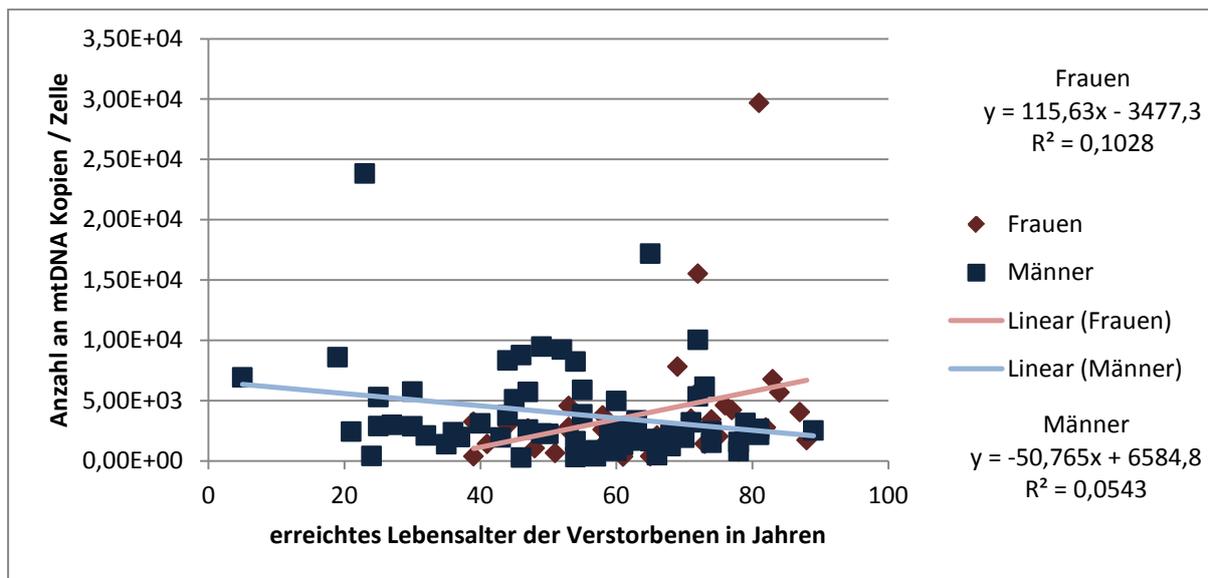
Bei Betrachtung der Anzahl Kopien mtDNA, bezogen auf das Geschlecht und das Alter der Verstorbenen, zeigt sich im **Mark des Großhirns** bei den weiblichen Verstorbenen ein marginaler **nicht signifikanter Anstieg** ( $R^2 = 0,0076$ ) und bei den männlichen Verstorbenen ein marginaler **nicht signifikanter Rückgang** ( $R^2 = 0,0034$ ) der Kopien mit steigendem erreichtem Lebensalter (Abb.38).



**Abbildung 38: Abhängigkeit der mtDNA-Kopien im Mark des Großhirns zum Lebensalter.** Bei Extrapolation einer durchschneidenden Trendlinie zeigt sich bei den weiblichen Verstorbenen ein marginaler nicht signifikanter Anstieg ( $R^2 = 0,0076$ ) und bei den männlichen Verstorbenen ein marginaler nicht signifikanter Rückgang ( $R^2 = 0,0034$ ) der Kopien mit steigendem erreichtem Lebensalter

## Ergebnisse

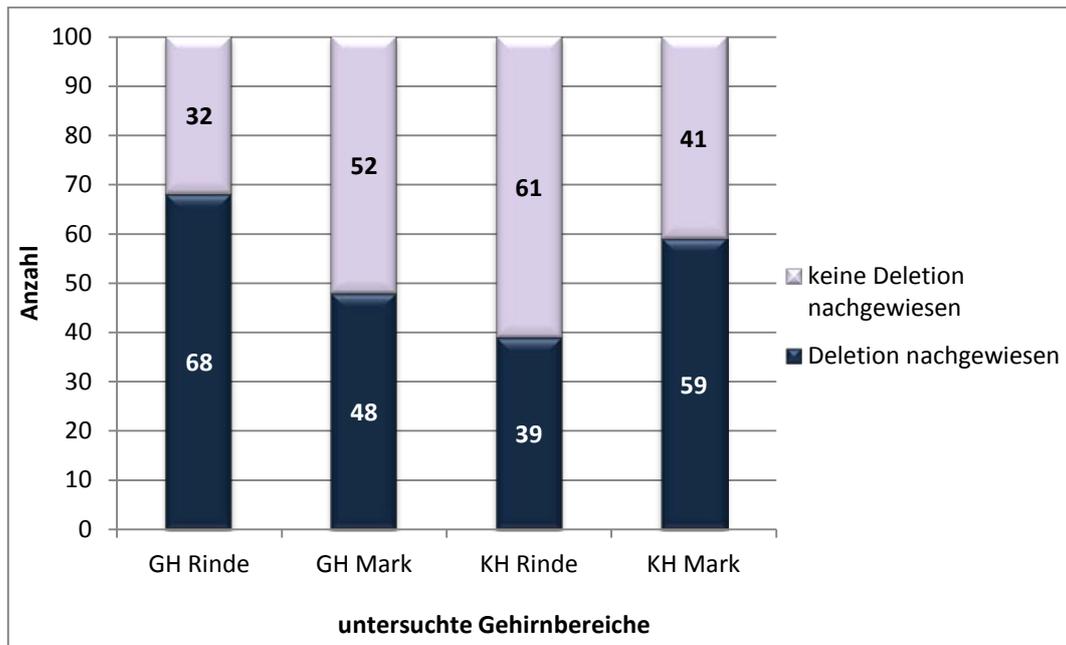
Bei Prüfung der Ergebnisse bezogen, auf das Geschlecht und das Alter der Verstorbenen, ergab sich bei Extrapolation einer Trendlinie durch alle Messergebnisse für die Kopienzahl der mtDNA im Mark des Kleinhirns (Abb.39) für die weiblichen Verstorbenen ein **nicht signifikanter Anstieg** ( $R^2 = 0,1028$ ) und für die männlichen Verstorbenen ein **nicht signifikanter Rückgang** ( $R^2 = 0,0543$ ) der mtDNA-Kopien mit steigendem erreichtem Lebensalter.



**Abbildung 39: Abhängigkeit der mtDNA-Kopien im Mark des Kleinhirns zum Lebensalter.** Bei Extrapolation einer durchschneidenden Trendlinie zeigt sich bei den Frauen einen leichten Anstieg und bei den Männern einen Rückgang der Kopienzahl mtDNA im Alter.

### 4.3.3 Quantifizierung der 4977bp Deletion der mtDNA

Der Nachweis der dmtDNA<sup>4977</sup> erfolgte wie unter 3.3.2.2 beschrieben. Insgesamt wurde in 214 von 400 Proben eine Deletion nachgewiesen. In Abbildung 40 sind die Anzahl der Deletionen dargestellt, die in den jeweiligen Gehirnbereichen im gesamten Probenkontigent nachgewiesen wurden.

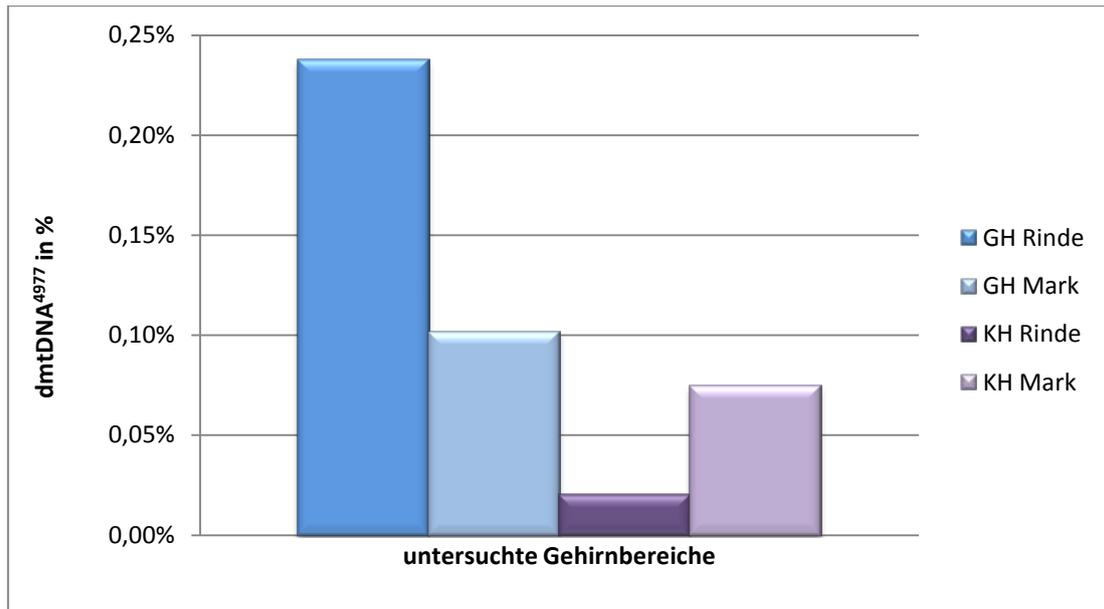


**Abbildung 40: Deletionsanteile in verschiedenen Gehirnbereichen.** Dargestellt ist die Anzahl der Deletionen, die in den jeweiligen Gehirnbereichen im Gesamten Probenkontigent nachgewiesen wurden. Die Anzahl der Proben mit einer Deletion zeigen die dunkelblauen Balken und die Anzahl der Proben in den keine Deletion nachgewiesen wurden die hellvioletten Balken.

#### 4.3.3.1 Vergleich des Rinden- und Markbereiches in Großhirn und Kleinhirn

Im **Großhirn** wurden im Mittel in der Rinde **0,24 %** und im Mark **0,1018 %** dmtDNA<sup>4977</sup> ermittelt. Im Vergleich dazu wurden im **Kleinhirn** in der Rinde **0,0202 %** und im Mark **0,0744 %** dmtDNA<sup>4977</sup> nachgewiesen (Abb. 41).

## Ergebnisse



**Abbildung 41: Vergleich des prozentualen Anteils der dmtDNA<sup>4977</sup> im Rinden- und Mark-Bereich des Groß- und Kleinhirns.** Dargestellt sind die Mittelwerte GH = Großhirn, KH = Kleinhirn. Die Großhirnrinde weist mit 0,24 % die höchste und die Kleinhirnrinde mit 0,0204 % die niedrigste Deletionsrate auf.

### 4.3.3.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

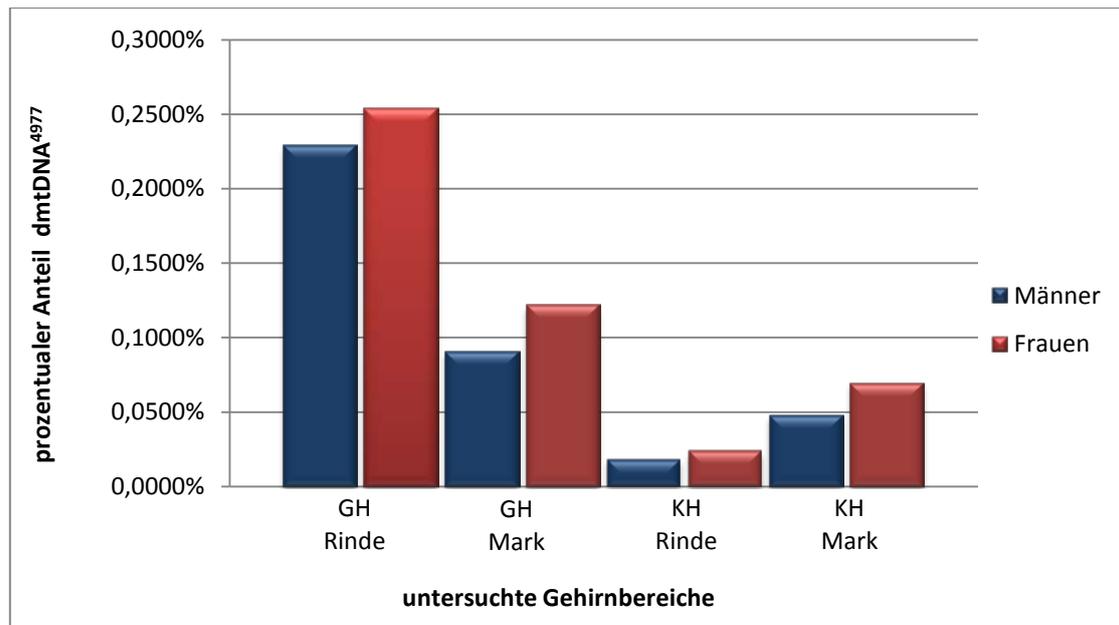
Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung zeigte sich bei den männlichen Verstorbenen im **Rindenbereich des Groß- und Kleinhirns** im Mittel ein Anteil von **0,2291 %** bzw. **0,0181 %** dmtDNA<sup>4977</sup>. Bei den weiblichen Verstorbenen wurden in der **Großhirnrinde** **0,2540 %** und im **Kleinhirn** **0,0235 %** dmtDNA<sup>4977</sup> nachgewiesen (Abb.42).

Im **Mark des Großhirns** wurde bei den männlichen Verstorbenen im Mittel **0,0902 %** und **0,0472%** dmtDNA<sup>4977</sup> im **Kleinhirn** detektiert. Bei den weiblichen Verstorbenen zeigte sich im **Mark des Großhirns** **0,1214%** und des **Kleinhirns** **0,0693 %** dmtDNA<sup>4977</sup>.

Die statistische Betrachtung ergab für den Vergleich des dmtDNA<sup>4977</sup>-Anteils beider Gruppen für die Rindenbereiche und für die Markbereiche P-Value-Werte über 0,05. Dies ist als **nicht signifikant** zu werten.

Bei der geschlechtsspezifischen Betrachtung des erreichten Lebensalters und des prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> ergab sich bei allen untersuchten Gehirnbereichen und bei beiden Geschlechtern eine **signifikante** Korrelation (P-Value siehe Tab. ).

## Ergebnisse

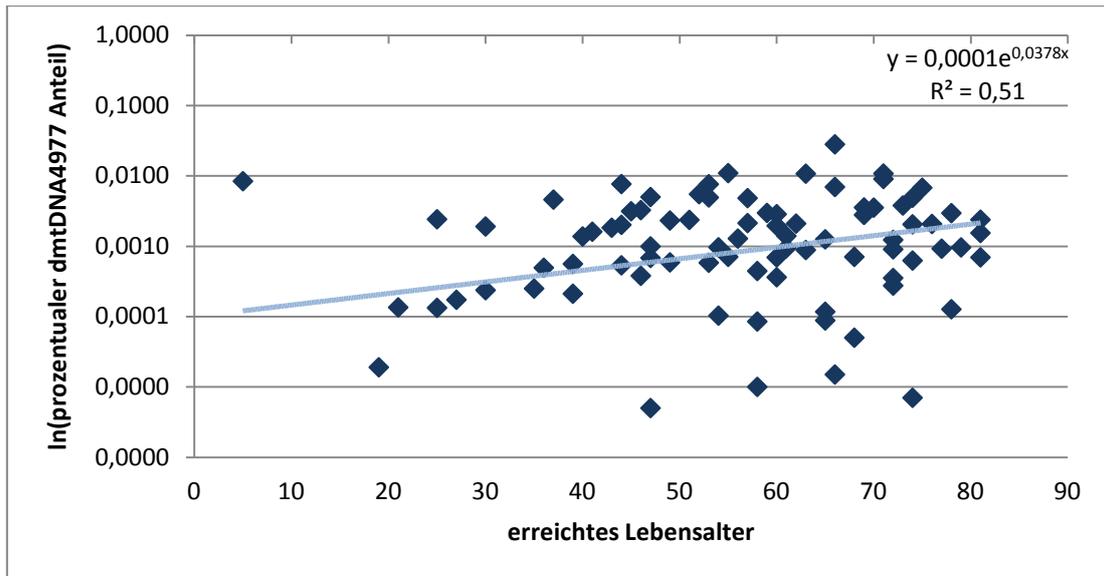


**Abbildung 42: Geschlechtsspezifischer Vergleich des Rinden- und Mark-Bereichs im Groß- und Kleinhirn.** In allen untersuchten Gehirnbereichen weisen die Frauen einen höheren Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> auf. Dargestellt sind die Mittelwerte. GH = Großhirn, KH = Kleinhirn. Der geschlechtsspezifische Vergleich des dmtDNA<sup>4977</sup>-Anteils beider Gruppen ist nicht signifikant und zeigt einen P-Value von 0,14 (GH) / 0,17 (KH) für die Rindenbereiche und 0,44 (GH) / 0,85 (KH) für die Markbereiche.

### 4.3.3.3 Alterskorrelierende Unterschiede

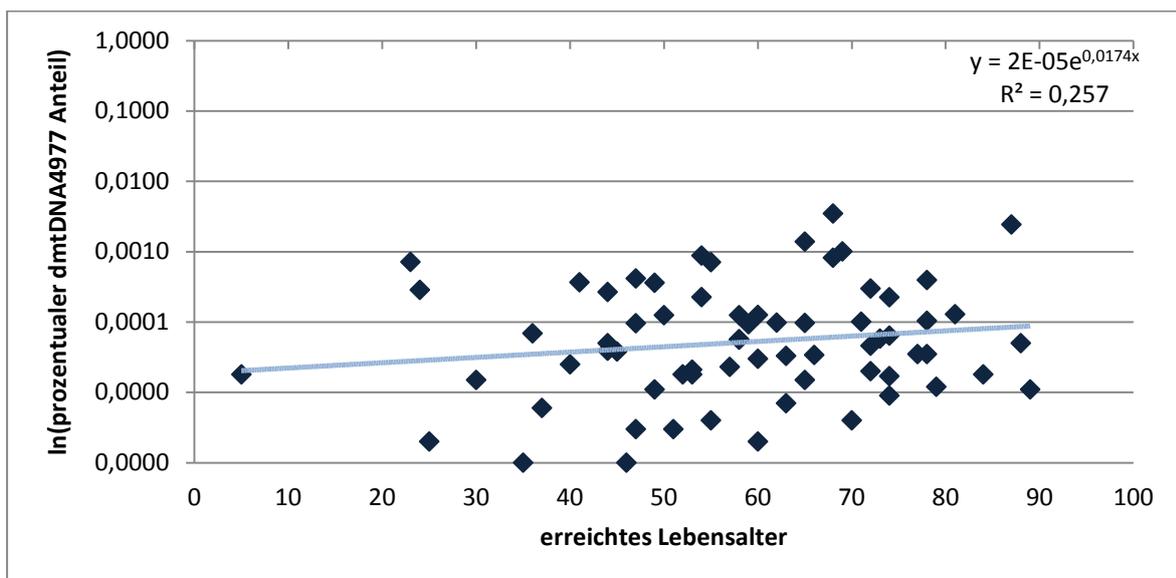
Die Prüfung der vorliegenden Parameter, bezogen auf das erreichte Lebensalter der Verstorbenen und dem prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup>, ergab bei der Extrapolation einer exponentiellen Trendlinie durch alle logarithmisch aufgetragenen Messergebnisse in der **Großhirnrinde** (Abb. 43) einen **signifikanten Anstieg** der dmtDNA<sup>4977</sup> mit steigendem erreichten Lebensalter ( $R^2 = 0,51$ ) und einem P-Value von  $5,026 \times 10^{-32}$ .

## Ergebnisse



**Abbildung 43: Abhängigkeit des prozentualen Anteils an dmtDNA4977 in der Großhirnrinde zum Lebensalter** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Die extrapolierte, die Werte durchschneidende exponentielle Trendlinie zeigt einen marginalen jedoch signifikanten Anstieg der Kopien dmtDNA<sup>4977</sup> im Alter.

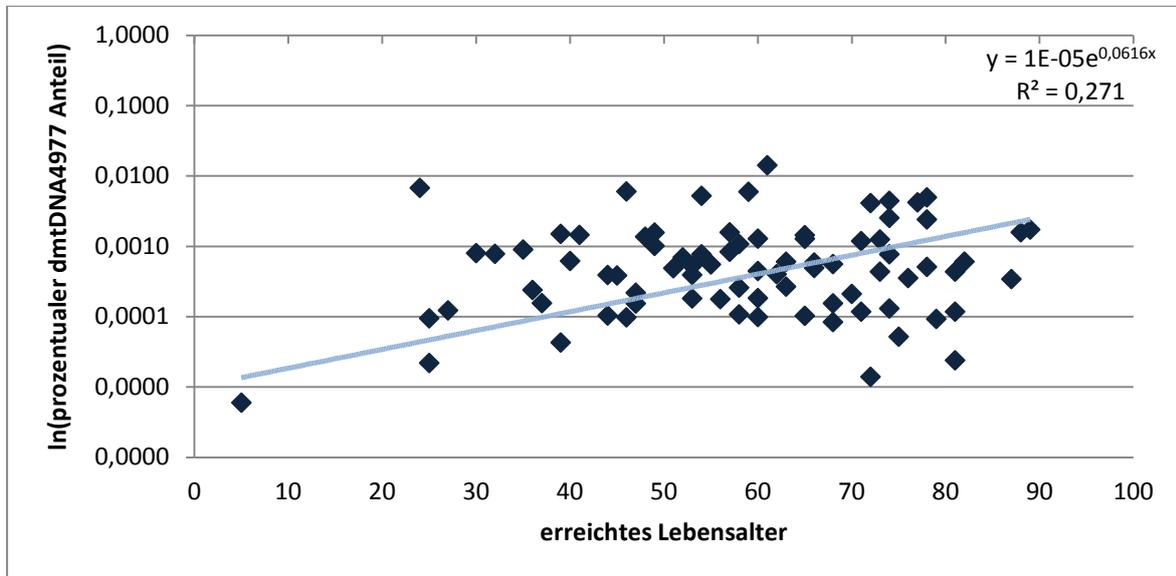
Bei Betrachtung des prozentualen Anteils der dmtDNA<sup>4977</sup> bezogen auf das erreichte Lebensalter der Verstorbenen, zeigt sich in der Rinde des **Kleinhirns** ein **marginaler** ( $R^2 = 0,257$ ) jedoch **signifikanter Anstieg** ( $P\text{-Value} = 3,212 \times 10^{-30}$ ) der dmtDNA<sup>4977</sup> mit steigendem erreichtem Lebensalter (Abb.44).



**Abbildung 44: Abhängigkeit des prozentualen Anteils an dmtDNA4977 in der Kleinhirnrinde zum Lebensalter.** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Die extrapolierte, die Werte durchschneidende exponentielle Trendlinie zeigt einen marginalen jedoch signifikanten Anstieg der Kopien dmtDNA<sup>4977</sup> im Alter.

## Ergebnisse

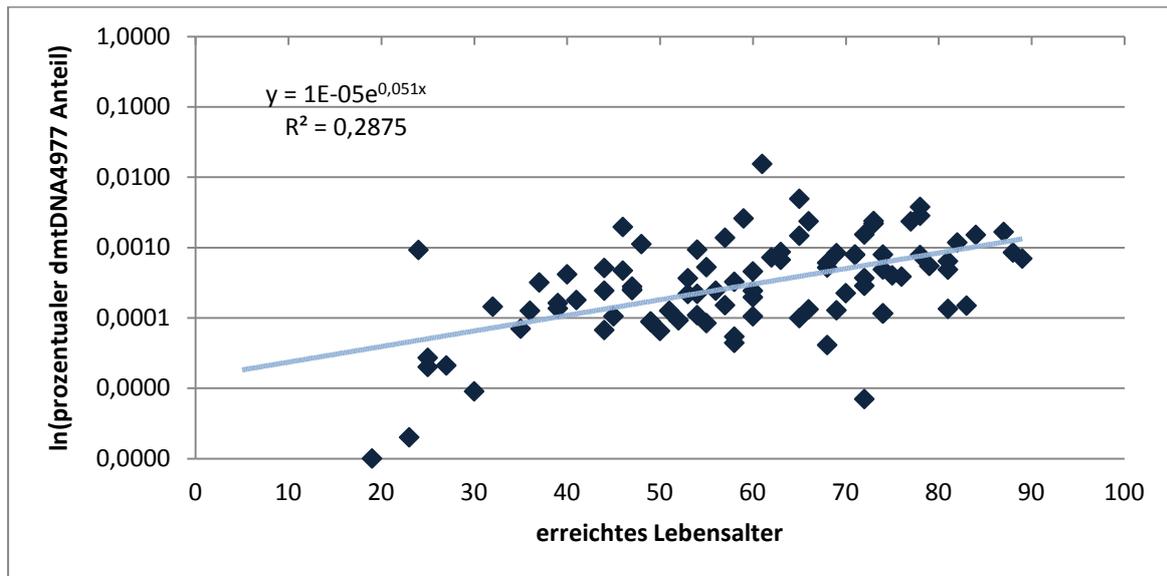
Die Prüfung der vorliegenden Parameter, bezogen auf das erreichte Lebensalter der Verstorbenen und dem prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup>, ergab bei der Extrapolation einer exponentiellen Trendlinie durch alle logarithmisch aufgetragenen Messergebnisse im **Mark des Großhirns** einen marginalen ( $R^2 = 0,271$ ), jedoch **signifikanten Anstieg** (P-Value =  $2,431 \times 10^{-33}$ ) der dmtDNA<sup>4977</sup> mit steigendem erreichten Lebensalter ( Abb. 45).



**Abbildung 45: Abhängigkeit des prozentualen Anteils an dmtDNA4977 im Mark des Großhirns zum Lebensalter.** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Die extrapolierte, die Werte durchschneidende exponentielle Trendlinie zeigt einen marginalen jedoch signifikanten Anstieg der Kopien dmtDNA<sup>4977</sup> im Alter.

## Ergebnisse

Bei Betrachtung der vorliegenden Parameter, bezogen auf den prozentualen Anteil der dmtDNA<sup>4977</sup> und das Alter der Verstorbenen, ergab sich bei der Extrapolation einer exponentiellen Trendlinie durch alle logarithmisch aufgetragenen Messergebnisse für den prozentualen Anteil der dmtDNA<sup>4977</sup> im **Mark des Kleinhirns** (Abb. 46) ein **signifikanter Anstieg** der dmtDNA<sup>4977</sup> mit steigendem erreichten Lebensalter ( $R^2 = 0,2875$ ,  $P\text{-Value} = 5,37 \times 10^{-34}$ ).



**Abbildung 46: Abhängigkeit des prozentualen Anteils an dmtDNA4977 im Mark des Kleinhirns zum Lebensalter.** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Die extrapolierte, die Werte durchschneidende exponentielle Trendlinie zeigt einen marginalen jedoch signifikanten Anstieg der Kopien dmtDNA<sup>4977</sup> im Alter.

#### 4.3.4 Analyse der Stressproteine HSPA8 und HSPA1A

Der quantitative Nachweis der Proteine im Western Blot gelang nur in den Rindenproben des Groß- und Kleinhirns. Der Nachweis von HSPA8 konnte in allen 200 Proben erfolgreich durchgeführt werden, während der Nachweis von HSPA1A in 3 (1,5 %) der 200 Proben nicht gelang.

##### 4.3.4.1 Vergleich der HSPA8 Konzentration im Groß- und Kleinhirn

Im Großhirn konnte eine HSPA-Konzentration im Mittel von **9,46** µg Protein / µl Extrakt nachgewiesen werden. Im Gewebe der Kleinhirnrinde konnte in den Proben ein Mittelwert von **13,7** µg HSPA8 / µl Extrakt nachgewiesen werden.

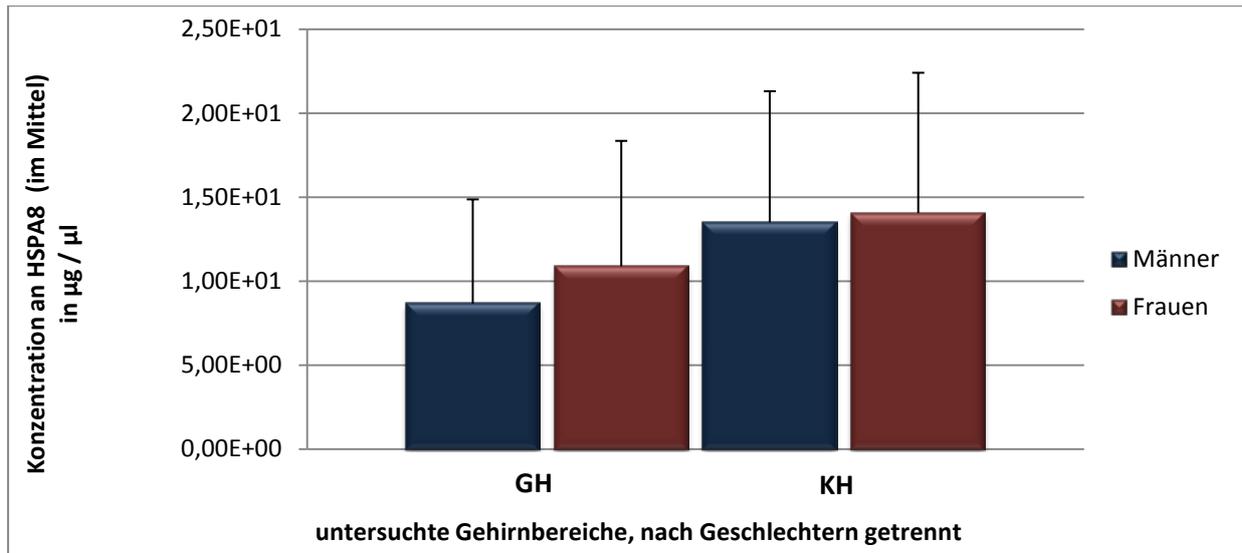
##### 4.3.4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei HSPA8

Beim geschlechtsspezifischen Vergleich zeigte sich ein Mittelwert an HSPA8 im **Großhirnrindengewebe** weiblicher Verstorbener mit **10,88** µg / µl Extrakt, der um **20 % höher** liegt als bei männlichen Verstorbenen mit **8,66** µg / µl (Abb. 47).

Beim Vergleich beider Geschlechter deutet der P-Value von **0,1449** auf **keine Signifikanz hin**. Beim geschlechtsspezifischen Vergleich im **Kleinhirn** zeigte sich bei den weiblichen Verstorbenen ein Mittelwert an HSPA8 mit **14,58** µg / µl Extrakt, der um **9 % höher** liegt als bei männlichen Verstorbenen mit **13,2** µg / µl.

Der Vergleich der HSPA8 Konzentration männlicher und weiblicher Verstorbener zeigte sowohl im Großhirn als auch im Kleinhirn **keinen signifikanten Unterschied**.

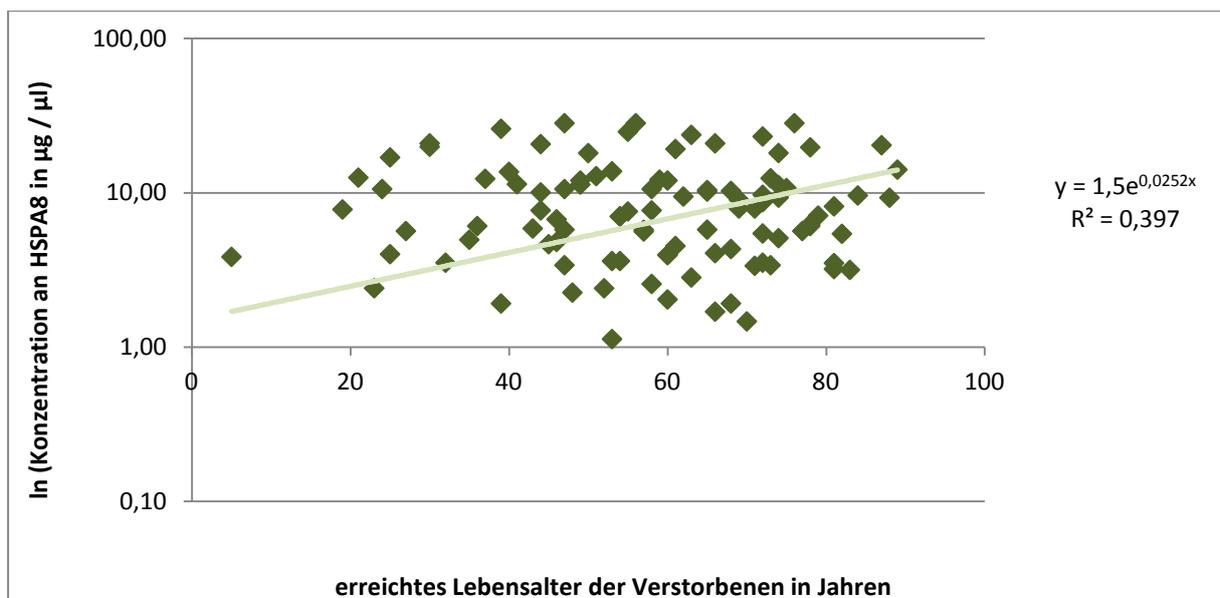
## Ergebnisse



**Abbildung 47: Geschlechtsspezifische Verteilung der HSPA8-Proteinmenge im Großhirn und Kleinhirn.** Angegeben sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Im Großhirnrindengewebe weiblicher Verstorbener lag der Gehalt an HSPA8 im Mittel um 20 % höher als bei den männlichen Verstorbenen. Während im Kleinhirn bei den weiblichen Verstorbenen nur eine 9% höhere Konzentration an HSPA8 ermittelt werden konnte.

### 4.3.4.3 Altersbedingte Unterschiede bei HSPA8

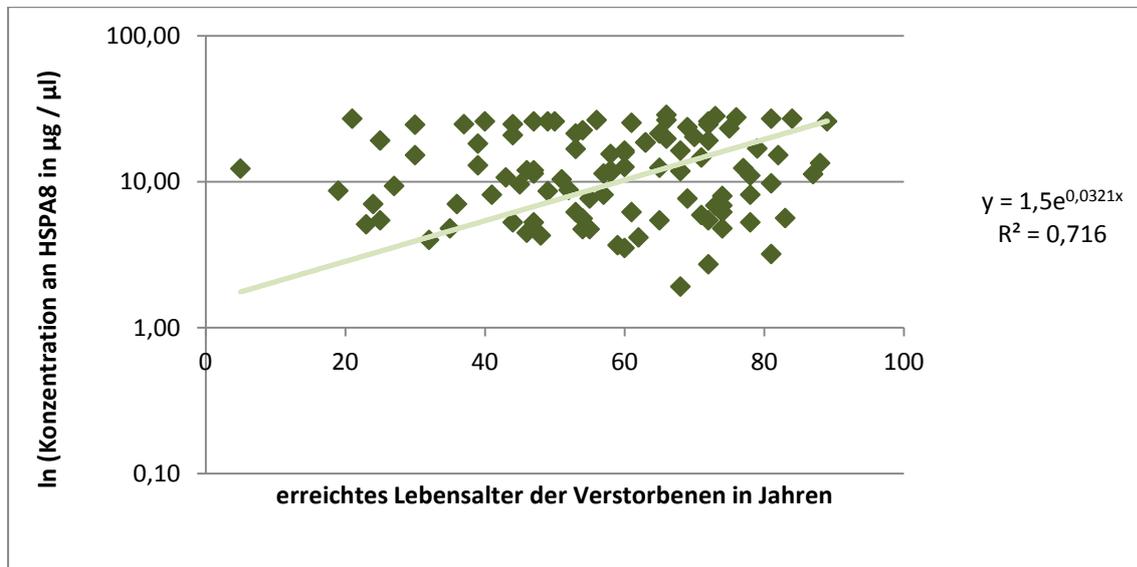
Bei der Betrachtung der **Großhirnproben** bezüglich des erreichten Lebensalters zeigte sich ein marginaler ( $R^2 = 0,397$ ), jedoch **signifikanter Anstieg** ( $P\text{-Value} = 7,249 \times 10^{-33}$ ) der Proteinmenge an HSPA8 mit steigendem erreichtem Lebensalter (Abb. 48).



**Abbildung 48: Verteilung der HSPA8-Proteinmenge im Großhirn in Abhängigkeit zum, Lebensalter.** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen mit exponentieller Trendlinie. Bei der Betrachtung der Großhirnproben bezüglich des erreichten Lebensalters zeigte sich ein leichter, jedoch signifikanter Rückgang ( $P\text{-Value} = 7,249 \times 10^{-33}$  und  $R^2 = 0,397$ ) der Proteinmenge an HSPA8 mit steigendem Lebensalter.

## Ergebnisse

In den **Kleinhirnproben** zeigte sich bezüglich des erreichten Lebensalters ein Anstieg an HSPA8 mit steigendem erreichten Lebensalter (Abb. 49). Es ergab sich eine hohe Signifikanz im Vergleich des erreichten Lebensalters mit der HSPA8-Konzentration mit einem P-Value von  $1,448 \times 10^{-31}$  und einem Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0,716$ .



**Abbildung 49: Verteilung der HSPA8-Proteinmenge im Kleinhirn in Abhängigkeit zum Lebensalter.** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen mit exponentieller Trendlinie. In den Kleinhirnproben zeigt sich bezüglich des erreichten Lebensalters ein Anstieg an HSPA8 mit steigendem erreichten Lebensalter. Es ergab sich eine hohe Signifikanz im Vergleich des erreichten Lebensalters mit der HSPA8-Konzentration mit einem P-Value von  $1,448 \times 10^{-31}$ .

#### 4.3.4.4 Vergleich der HSPA1A-Konzentration im Groß- und Kleinhirn

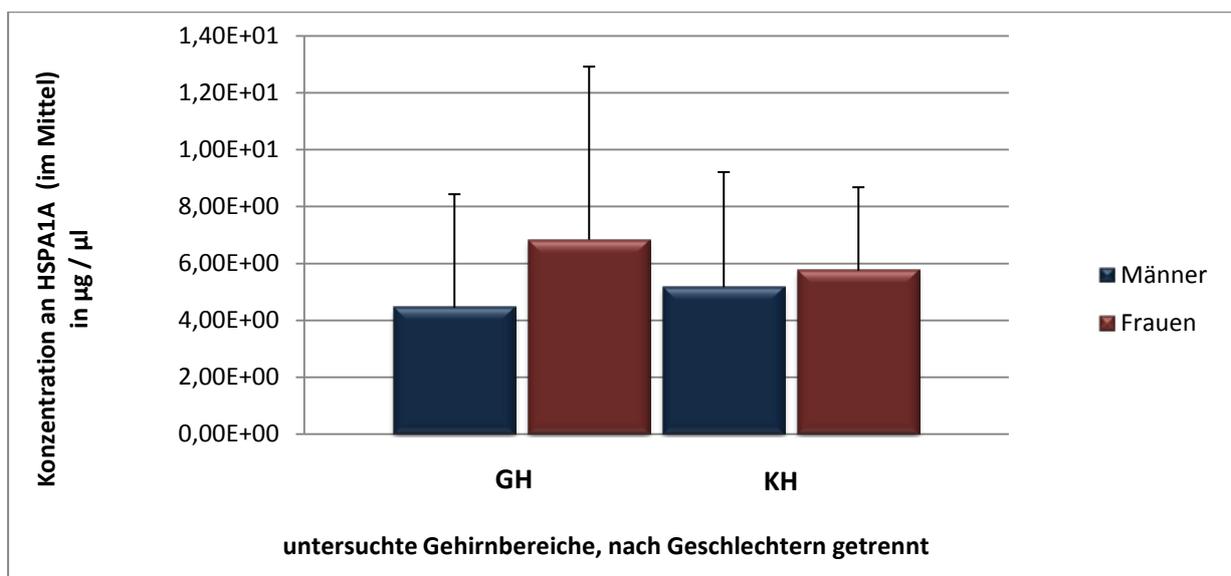
In der Rinde des Großhirngewebes ließ sich im Mittel **5,31**  $\mu\text{g}$  induziertes Stressprotein (HSPA1A) pro  $\mu\text{l}$  Extrakt detektieren. Im Gewebe der Kleinhirnrinde konnte in den Proben ein Mittelwert von **5,35**  $\mu\text{g}$  HSPA1A /  $\mu\text{l}$  Extrakt nachgewiesen werden.

#### 4.3.4.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei HSPA1A

In den Proben des Großhirnrindengewebes der weiblichen Verstorbenen war im Mittel ein **32 % höherer** Gehalt an induziertem Stressprotein nachweisbar. Bei weiblichen Verstorbenen wurden im Mittel **6,84**  $\mu\text{g}$  HSPA1A /  $\mu\text{l}$  Extrakt nachgewiesen, während bei den männlichen Verstorbenen ein Wert von **4,45**  $\mu\text{g}$  HSPA1A /  $\mu\text{l}$  Extrakt ermittelt werden konnte. Der P-Value von **0,0335** weist auf eine **leichte Signifikanz** hin.

Der Vergleich der Proteinmengen männlicher und weiblicher Verstorbener zeigte im Großhirn mit einem P-Value von **0,0335** eine **leichte Signifikanz**.

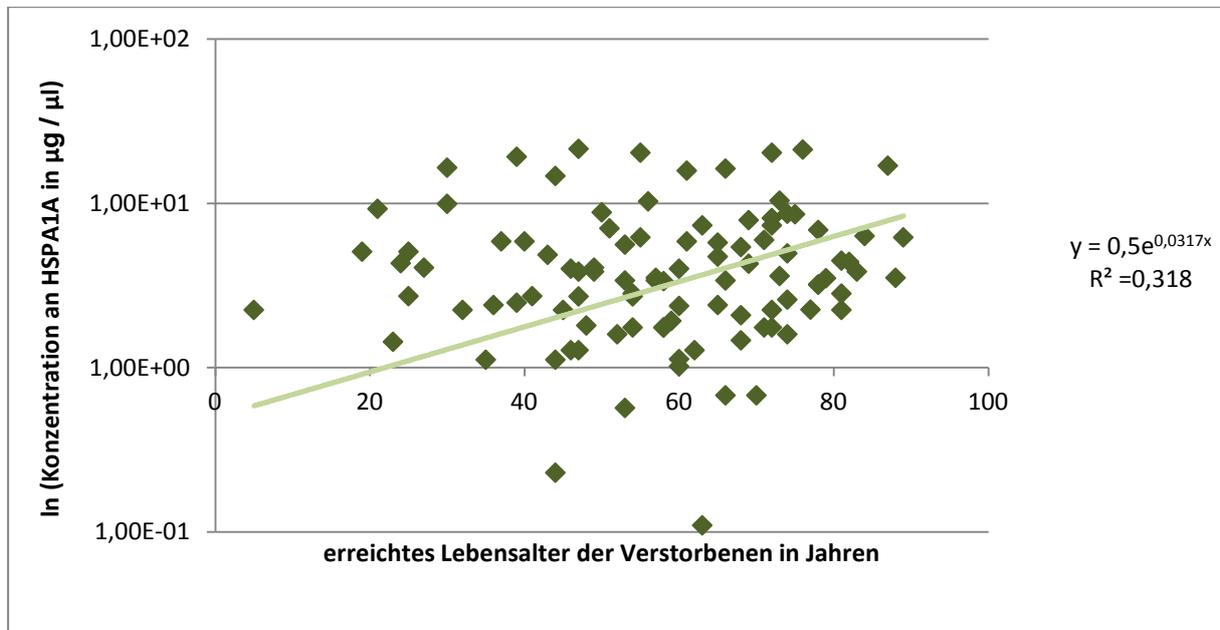
Beim geschlechtsspezifischen Vergleich im Kleinhirn zeigte sich bei den weiblichen und männlichen Verstorbenen ein nahezu gleicher Gehalt an HSPA1A mit **5,68**  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$  Extrakt für die Frauen und **5,16**  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$  für die Männer (Abb. 50) und ein P-Value von **0,1077**. Dies ist als **nicht signifikant zu werten**.



**Abbildung 50: Geschlechtsspezifische Verteilung der HSPA1A-Proteinmenge im Großhirn und Kleinhirn.** Angegeben sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen. Im Großhirn der weiblichen Verstorbenen konnte im Mittel eine 32 % höhere Konzentration an HSPA1A nachgewiesen werden als bei den männlichen Verstorbenen. Im Kleinhirn war der Gehalt an HSPA1A in beiden untersuchten Gruppen nahezu gleich.

#### 4.3.4.6 Altersbedingte Unterschiede bei HSPA1A

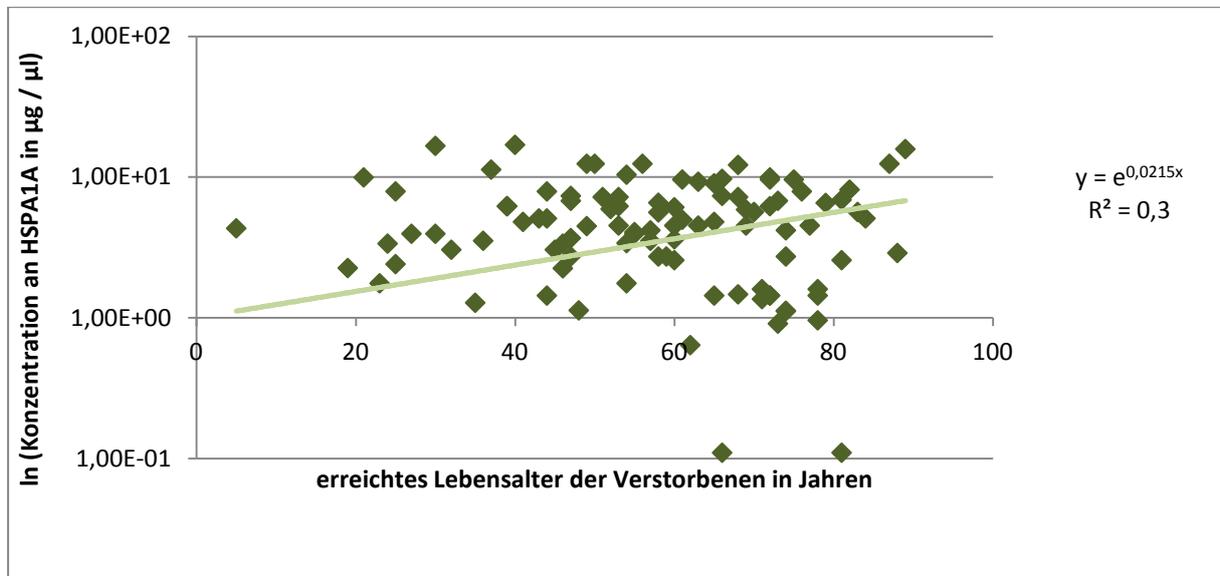
Unter Betrachtung aller Proben für die Rinde des **Großhirns** zeigte sich ein marginaler, aber **signifikanter Anstieg** der Proteinmenge an HSPA1A mit steigendem erreichtem Lebensalter der Verstorbenen (Abb. 51) mit einem P-Value von  $8,869 \times 10^{-34}$ .



**Abbildung 51: Verteilung der HSPA1A-Proteinmenge im Großhirn in Abhängigkeit zum Lebensalter.** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen mit exponentieller Trendlinie. Für die Proben Großhirns zeigte sich ein leichter, jedoch signifikanter Anstieg der Proteinmenge an HSPA1A mit steigendem erreichtem Lebensalter der Verstorbenen mit einem P-Value von  $8,869 \times 10^{-34}$ .

## Ergebnisse

In den **Kleinhirnproben** zeigte sich bezüglich des erreichten Lebensalters ebenfalls ein leichter Anstieg an HSPA1A mit steigendem erreichtem Lebensalter (Abb. 52). Es ergab sich eine hohe Signifikanz bezüglich einer Korrelation zwischen dem erreichten Lebensalters und der HSPA1A-Konzentration mit einem P- Value von  $9,6986 \times 10^{-34}$ .



**Abbildung 52: Verteilung der HSPA1A-Proteinmenge im Kleinhirn in Abhängigkeit zum Lebensalter.** Die Werte sind logarithmisch aufgetragen mit exponentieller Trendlinie. Es ergab sich eine hohe Signifikanz im Vergleich des erreichten Lebensalters mit der HSPA1A-Konzentration mit einem P- Value von  $9,6986 \times 10^{-34}$ .



## Ergebnisse

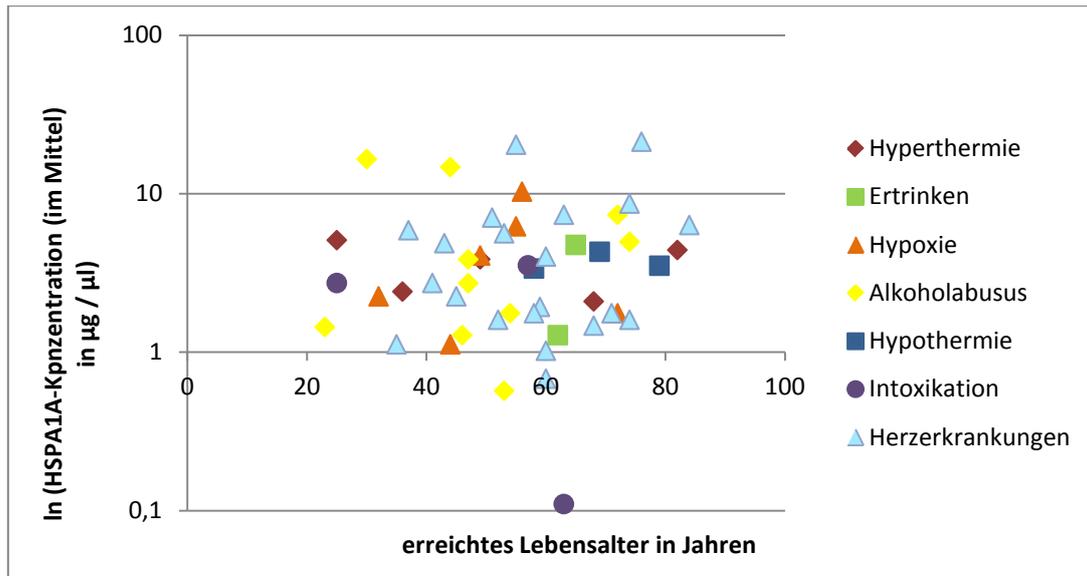
**Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der HSPA8-Konzentration bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Großhirnrinde. Die Konzentration wurde mit der Membralyzer Software bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 52 graphisch dargestellt.

Probennummer	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Todesursache	HSPA8- Konzentration
G052	56	männlich	Asphyxie, Erdrosseln	28,29
G003	76	weiblich	Herzbeutelamponade	28,29
G024	55	männlich	Herztod	24,9
G051	63	männlich	akuter Herztod	23,77
G034	30	männlich	Hämorrhagischer Schock, Alkoholabusus	20,94
G023	44	männlich	verbluten nach Herzstich, Alkoholabusus	20,71
G069	74	weiblich	Herztod	18,13
G007	25	männlich	Hyperthermie, Verkehrsunfall	16,98
G100	53	weiblich	akuter Herztod	13,8
G078	51	weiblich	Rechtsherzversagen	12,84

Beim Vergleich des HSPA1A-Gehalts mit den Todesursachen zeigt sich, dass Personen mit Herzerkrankungen, Hypoxie und chronischem Alkoholabusus als Todesursache ebenfalls eine erhöhte HSPA1A-Konzentration aufweisen (Abb. 54).

Eine Alterskorrelation konnte dabei weder für HSPA8 noch für HSPA1A nachgewiesen werden (Tab. 4).

## Ergebnisse



**Abbildung 54: Abhängigkeit unterschiedlicher Todesursachen zur HSPA1A-Konzentration**  
 Dargestellt sind die Einzelwerte aus dem Rindenbereich des Großhirns. Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Der Vergleich der verschiedenen Todesursachen mit der HSPA1A-Konzentration ergibt die höchsten Konzentrationen bei Verstorbenen mit Herzerkrankungen, Hypoxie und chronischem Alkoholabusus. Eine Alterskorrelation ist nicht nachzuweisen.

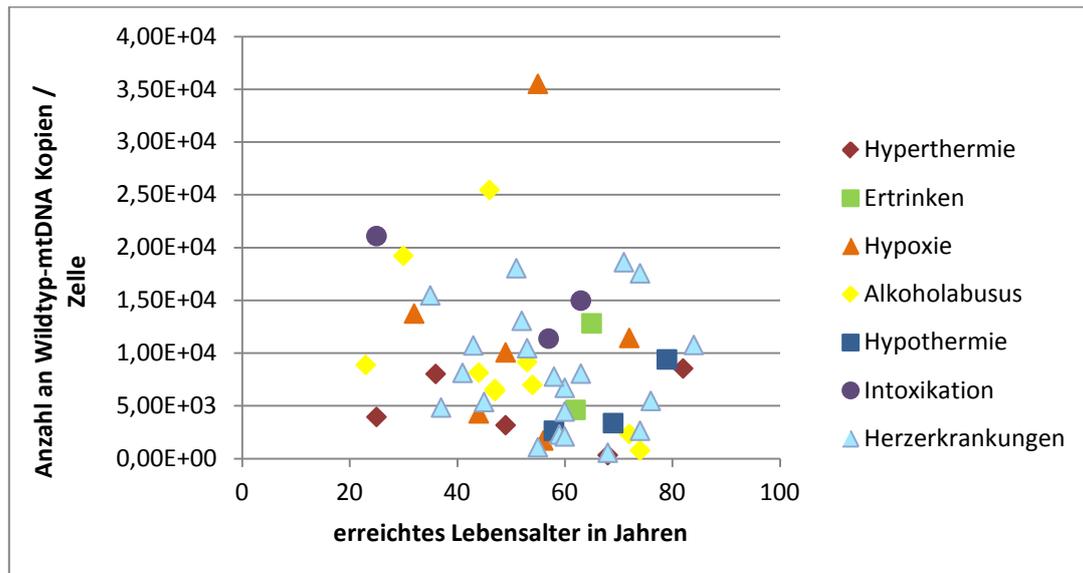
**Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der HSPA1A-Konzentration bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Großhirnrinde. Die Konzentrationen wurden mit der Membralyzer Software bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 53 graphisch dargestellt.

Probennummer	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Todesursache	HSPA1A-Konzentration
G003	76	weiblich	Herzbeutelamponade	21,28
G024	55	männlich	Herztod	20,37
G034	30	männlich	Hämorrhagischer Schock, Alkoholabusus	16,52
G023	44	männlich	verbluten nach Herzstich, Alkoholabusus	14,71
G052	56	männlich	Asphyxie, Erdrosseln	10,3
G069	74	weiblich	Herztod	8,66
G051	63	männlich	akuter Herztod	7,36
G026	72	weiblich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholabusus	7,36
G078	51	weiblich	Rechtsherzversagen	7,06
G036	84	weiblich	globales Herzversagen	6,34

## Ergebnisse

Die Bestimmung der mtDNA-Kopien / Zelle ergab in der Großhirnrinde in acht Fällen keine verwertbaren Daten oder die Proben wurden aufgrund der geringen Kopienzahl ( $\leq 1.000.000$ ) im Extrakt von der Wertung ausgenommen.

Bei der Betrachtung der Einzelwerte (Tab.5) zeigen Verstorbene mit einer Intoxikation, chronischem Alkoholabusus, Hypoxie und Herzerkrankungen eine vermehrte mtDNA-Kopien Anzahl pro Zelle (Abb. 55).



**Abbildung 55: Abhängigkeit unterschiedlicher Todesursachen zur Anzahl der mtDNA-Kopien / Zelle.** Dargestellt sind die Einzelwerte aus dem Rindenbereich des Großhirns. Bei der Betrachtung der Einzelwerte zeigten Verstorbene mit einer Intoxikation, chronischem Alkoholabusus und Hypoxie eine vermehrte mtDNA-Kopien Anzahl pro Zelle.

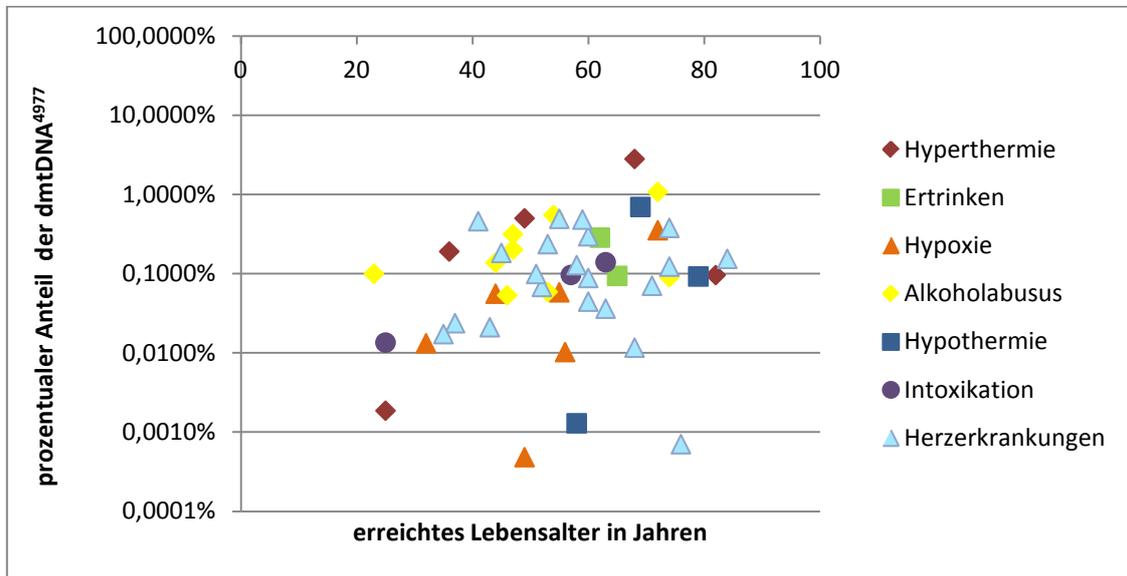
## Ergebnisse

**Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der mtDNA-Kopien / Zelle bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Großhirnrinde. Die Konzentrationen wurden mittels RTq-PCR bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 54 graphisch dargestellt.

Probennummer	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Todesursache	mtDNA-Kopien / Zelle
<b>G043</b>	55	männlich	atypisches Erhängen	35507,38
<b>G071</b>	46	männlich	Alkoholabusus	25446,94
<b>G082</b>	25	männlich	Intoxikation	21076,77
<b>G034</b>	30	männlich	Hämorrhagischer Schock, Alkoholabusus	19207,92
<b>G083</b>	71	männlich	Herzmuskelfarkt	18600,27
<b>G078</b>	51	weiblich	Rechtsherzversagen	18030,82
<b>G072</b>	74	männlich	Herztod	17550,61
<b>G073</b>	35	männlich	Herzinfarkt	15454,55
<b>G041</b>	63	männlich	zentrales Regulationsversagen, DD Vergiftung Opiate /Benzodiazepine	14958,22
<b>G077</b>	32	männlich	Hypoxie	13736,23

## Ergebnisse

Eine eindeutige Aussage bezüglich des Anteils dmtDNA<sup>4977</sup> bei bestimmten Todesursachen ist bei Betrachtung der Einzelwerte (Tab.6) aufgrund der zu niedrigen Fallzahlen nicht möglich (Abb. 56).



**Abbildung 56: Abhängigkeit unterschiedlicher Todesursachen zum prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup>.** Dargestellt sind die Einzelwerte aus dem Rindenbereich des Großhirns. Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Eine eindeutige Aussage bezogen auf die Erhöhung der dmtDNA<sup>4977</sup> bei bestimmten Todesursachen ist bei Betrachtung der Einzelwerte, aufgrund der zu niedrigen Fallzahlen nicht möglich.

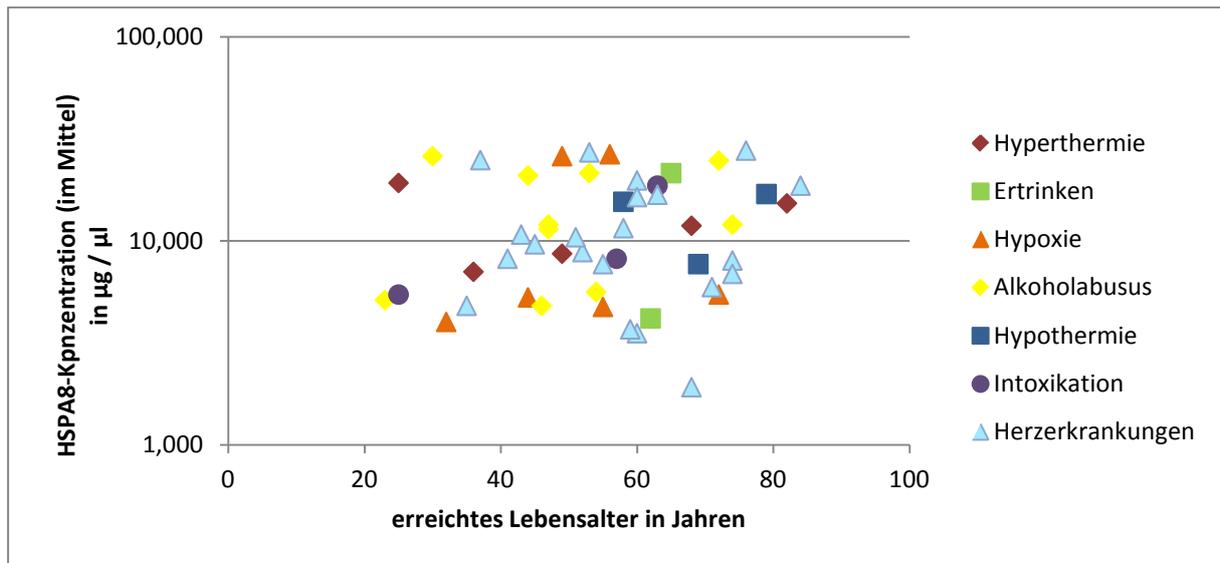
## Ergebnisse

**Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse des prozentualen Anteils an dmtDNA<sup>4977</sup> bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Großhirnrinde. Die Konzentrationen wurden mittels RTq-PCR bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 55 graphisch dargestellt.

<b>Probennummer</b>	<b>Alter (in Jahren)</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Todesursache</b>	<b>dmtDNA4977 (in Prozent )</b>
<b>G089</b>	68	männlich	Hyperthermie	2,8053%
<b>G026</b>	72	weiblich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholabusus	1,0779%
<b>G021</b>	69	weiblich	Hypothermie. Beginnende Leberzirrose	0,6952%
<b>G063</b>	54	männlich	zentrales Regulationsversagen, Alkoholabusus	0,5491%
<b>G096</b>	49	männlich	Hyperthermie	0,5004%
<b>G024</b>	55	männlich	Herztod	0,4931%
<b>G076</b>	59	männlich	Herzinfarkt	0,4824%
<b>G061</b>	41	weiblich	Rechtsherzversagen	0,4596%
<b>G069</b>	74	weiblich	Herztod	0,3790%
<b>G084</b>	72	weiblich	Ersticken, Bollustod	0,3535%

#### 4.3.5.2 Ergebnisse im Kleinhirn

Im **Kleinhirn** konnte in allen Proben HSPA8 und HSPA1A nachgewiesen werden. Eine eindeutige Aussage bezüglich der HSPA8-Konzentration bei bestimmten Todesursachen (Tab. 7) ist bei Betrachtung der Einzelwerte aufgrund der zu niedrigen Fallzahlen nicht möglich (Abb. 57).



**Abbildung 57: Abhängigkeit unterschiedlicher Todesursachen zur HSPA8-Konzentration.** Dargestellt sind die Einzelwerte aus dem Rindenbereich des Kleinhirns. Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Ein erhöhter HSPA8-Gehalt ist nicht einer bestimmten Todesursache zu zuordnen.

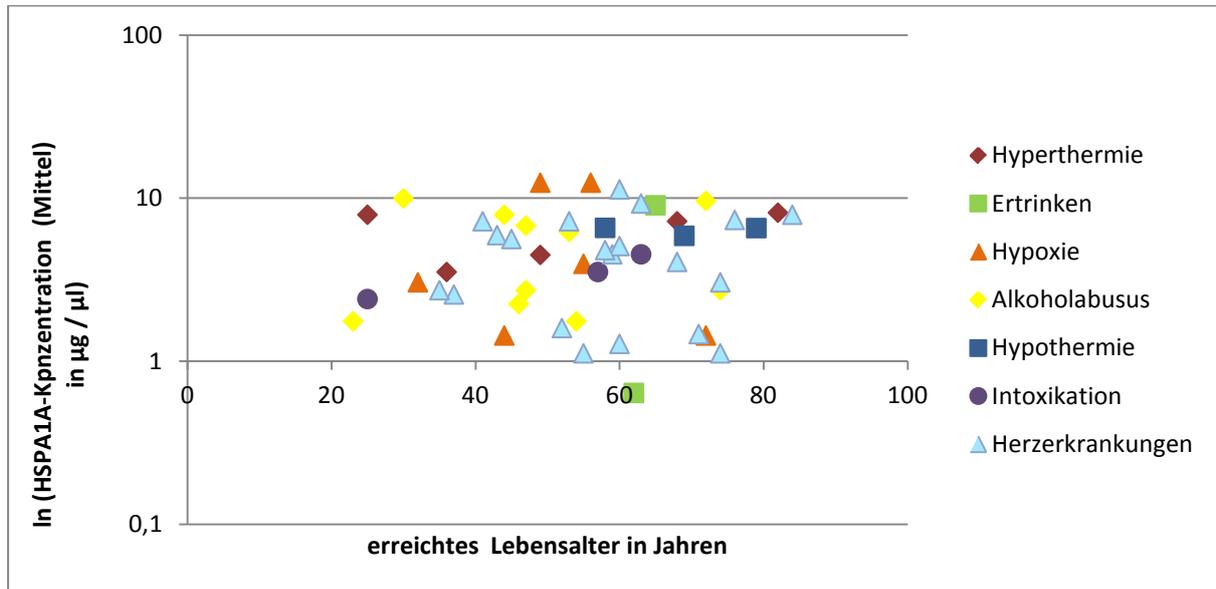
## Ergebnisse

**Tabelle 7 Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der HSPA8-Konzentration bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Kleinhirnrinde. Die Konzentration wurde mit der Membralyzer Software bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 56 graphisch dargestellt.

Probennummer	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Todesursache	HSPA8- Konzentration
G003	76	weiblich	Herzbeutelamponade	27,73
G036	84	weiblich	globales Herzversagen	27,16
G052	56	männlich	Asphyxie, Erdrosseln	26,590
G034	30	männlich	Hämorrhagischer Schock, Alkoholabusus	26,03
G047	49	männlich	Ersticken, Bollustod	26,03
G048	37	männlich	Herzinfarkt	24,9
G026	72	weiblich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholabusus	24,78
G050	65	männlich	Ertrinken	21,5
G040	53	weiblich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholabusus	21,5
G023	44	männlich	verbluten nach Herzstich, Alkoholabusus	20,94

## Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Einzelwerte (Tab. 8) lässt sich keine eindeutige Erhöhung der HSPA1A-Konzentration bei bestimmten Todesursachen feststellen (Abb. 58).



**Abbildung 58: Abhängigkeit der HSPA1A-Konzentration von unterschiedlichen Todesursachen.** Dargestellt sind die Einzelwerte aus dem Rindenbereich des Kleinhirns. Die Werte sind logarithmisch aufgetragen. Bei der Betrachtung zeigten Verstorbene mit einer Herzerkrankung, chronischem Alkoholabusus, Hypoxie und Hyperthermie einen leicht erhöhten Level an HSPA1A.

## Ergebnisse

**Tabelle 8 Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der HSPA1A-Konzentration bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Kleinhirnrinde. Die Konzentrationen wurden mit der Membralyzer Software bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 57 graphisch dargestellt.

Probennummer	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Todesursache	HSPA1A- Konzentration
G052	56	männlich	Asphyxie, Erdrosseln	12,45
G047	49	männlich	Ersticken, Bollustod	12,45
G048	37	männlich	Herzinfarkt	11,32
G034	30	männlich	Hämorrhagischer Schock, Alkoholabusus	9,96
G026	72	weiblich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholabusus	9,62
G051	63	männlich	akuter Herztod	9,28
G050	65	männlich	Ertrinken	9,05
G058	82	weiblich	Hyperthermie, CO-Intoxikation	8,15
G003	76	weiblich	Herzbeutelamponade	7,92
G023	44	männlich	verbluten nach Herzstich, Alkoholabusus	7,92

Die Bestimmung der mtDNA-Kopien / Zelle war im Kleinhirn in 17 Proben nicht möglich oder die Proben wurden aufgrund der geringen Kopienzahl ( $\leq 1.000.000$ ) im Extrakt von der Wertung ausgenommen.

Bei der Betrachtung der Einzelwerte (Tab. 9) zeigen Verstorbene mit einer Herzerkrankung und Hypoxie eine vermehrte mtDNA-Kopien Anzahl pro Zelle (Abb. 59).



## Ergebnisse

**Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse der mtDNA-Kopien / Zelle bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Kleinhirnrinde. Die Konzentrationen wurden mittels RTq-PCR bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 58 graphisch dargestellt.

Probennummer	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Todesursache	mtDNA-Kopien / Zelle
<b>G076</b>	59	männlich	Herzinfarkt	43976,2
<b>G016</b>	68	männlich	Herztod	35838,2
<b>G042</b>	60	männlich	Herzinfarkt	25367,3
<b>G093</b>	74	männlich	Leberausfallkoma, Leberzirrose,Alkoholabusus	22023,1
<b>G058</b>	82	weiblich	Hyperthermie, CO-Intoxikation	15320,4
<b>G040</b>	53	weiblich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholabusus	9567,57
<b>G003</b>	76	weiblich	Herzbeutelamponade	7614,87
<b>G044</b>	79	männlich	subakute Koronarinsuffizienz, finale Unterkühlung	5712,03
<b>G078</b>	51	weiblich	Rechtsherzversagen	5296,86
<b>G083</b>	71	männlich	Herzmuskelfarkt	4938,79



## Ergebnisse

**Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Analyseergebnisse des prozentualen Anteils an dmtDNA<sup>4977</sup> bei verschiedenen Todesursachen.** Angegeben sind die zehn höchsten Messwerte in der Kleinhirnrinde. Die Konzentrationen wurden mittels RTq-PCR bestimmt. Zusätzlich sind das Alter der Verstorbenen und das Geschlecht angegeben. Die Messwerte sind in Abb. 59 graphisch dargestellt.

<b>Probennummer</b>	<b>Alter (in Jahren)</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Todesursache</b>	<b>dmtDNA<sup>4977</sup> (in Prozent )</b>
<b>G016</b>	68	männlich	Herztod	0,3485%
<b>G021</b>	69	weiblich	Hypothermie. Beginnende Leberzirrose	0,1008%
<b>G063</b>	54	männlich	zentrales Regulationsversagen, Alkoholabusus	0,0880%
<b>G089</b>	68	männlich	Hyperthermie	0,0819%
<b>G088</b>	23	männlich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholabusus	0,0714%
<b>G024</b>	55	männlich	Herztod	0,0709%
<b>G022</b>	47	männlich	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, BAK 4,1%, Alkoholabusus	0,0416%
<b>G061</b>	41	weiblich	Rechtsherzversagen	0,0367%
<b>G096</b>	49	männlich	Hyperthermie	0,0361%
<b>G084</b>	72	weiblich	Ersticken, Bollustod	0,0299%

## **5 Diskussion**

### **5.1 Methodenetablierung**

#### **5.1.1 Extraktionsmethoden**

Für die Proteinextraktion wurden insgesamt sechs verschiedene Modifizierungen, die sich alle an dem Protokoll von Ikeda et al., 1998 und Block, 2006 mit Hilfe des für diese Untersuchung modifizierten Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffers (RIPA) von Block, 2006 orientieren, ausgetestet. Um die Proteine im Gewebe zu schonen, wurde zum einen die Inkubationszeit bei der Methode E2 bei 100 °C auf fünf Min. verkürzt und bei Methode E3 wurde die Zeit bei 60 °C auf eine Stunde verkürzt. Beides führte zu geringeren Proteinausbeuten. Die Inkubation auf Eis für 15 Min. (E4) lieferte mit Abstand das schlechteste Extraktionsergebnis. Eine Erhöhung der Temperatur von 60 °C auf 80 °C führte auch zu einer Verringerung der Ausbeuten. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei 80 °C über die Dauer von zwei Stunden die Proteine zerstört werden, während sich bei 60 °C die Proteinextraktion aus dem Gewebe und die minimale Zerstörung derselben nahezu angleichen.

Für das in Formalin fixierte Gewebe empfiehlt Ikeda et al eine SDS-Konzentration im RIPA-Puffer von 2 % anstatt 0,1 %. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass der 0,1 % Einsatz von SDS auch im formalinfixiertem Gewebe zu einer höheren Ausbeute an Proteinen führt. Dies kann daran liegen, dass für diese Arbeit nicht die Puffer-Rezeptur von Ikeda (Ikeda et al., 1998) verwendet wurde, sondern die zusätzlich leicht modifizierte von Block (Block 2006).

#### **5.1.2 SDS-PAGE**

Für die elektrophoretische Auftrennung wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell System von BIO-RAD verwendet. Beim Gießen der Gele ist es wichtig, die richtige Balance zwischen Länge und Dicke des Trenngels zu finden. Denn je länger und je dünner das Gel ist, desto besser werden die Proteine aufgetrennt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 %igen Trenngel bei 120 V und 110 mA für 90 Min. Mit dem System von BIO-RAD lassen sich die Gele problemlos gießen ohne Gefahr des Auslaufens des giftigen Acrylamids.

Entscheidend ist, dass immer ein Proteinmarker mitgeführt wird, dabei sollte darauf geachtet werden, dass dieser durch z. B. eine Vorfärbung die Laufeigenschaften verändert und damit nicht mehr zur Größenabschätzung geeignet ist.

### **5.1.3 Coomassie-Färbung**

Bei der Coomassie-Färbung handelt es sich um eine Methode durch die alle aufgetrennten Proteine auf einem Gel angefärbt werden. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Vorschriften getestet. Die Anforderungen an eine Färbemethode waren zum einem möglichst umwelt- und gesundheitsschonend zu sein und zum anderen die Zeit, die für die Färbung veranschlagt werden musste. Lediglich Methode drei aus dem Laborjournal erfüllte alle Anforderungen und zudem lieferte sie auch das beste Färbeergebnis. Nachteile dieser Methode sind die mäßige Sensitivität (**20 µg Protein / µl Extrakt**) und Spezifität. Diese Färbung eignet sich nur zur Überprüfung des Gellaufes und um die Probenqualität zu prüfen.

### **5.1.4 Western Blot**

Beim Blotten werden Proteine von einem Gel auf eine adsorbierende Membran übertragen. Die verwendete PVDF-Membran ist hydrophob sowie mechanisch und chemisch stabil. Ein Nachteil ist, dass diese Membran im Gegensatz zur Nylonmembran kleine Proteinmengen nicht vollständig bindet. Dies kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass alle Puffer giftiges Methanol enthalten. Es wurde ein Semi-Dry-Verfahren angewendet, so konnte der Einsatz von Methanol minimiert werden, da das Filterpapier nur in den jeweiligen Puffern angefeuchtet wurde. Beim Aufbau des Blots musste darauf geachtet werden, dass sich zwischen Gel und Membran keine Luftblasen befinden, damit es an dieser Stelle nicht zu einer Übertragung der Proteine kommen würde. Die Übertragungsdauer von hier ca. 90 Min. ist abhängig von der Größe der Proteine. Anschließend kann der Blot mit Hilfe der Amidoschwarz-Färbung angefärbt werden, wobei bedacht werden muss, dass diese Färbung irreversibel ist.

## Diskussion

Eine weitere und signifikantere Nachweismöglichkeit ist die Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper. Wichtig für die Genauigkeit dieser Methode ist die Spezifität der verwendeten Antikörper. Um die Sensitivität noch zu steigern, wurde das Zweischnitt-Verfahren angewendet. Hier bindet zunächst ein unmarkierter hochspezifischer Primärantikörper an das Antigen und wird dann in einer zweiten Reaktion mit einem enzymmarkierten Sekundärantikörper gekoppelt. In einer letzten Reaktion wird das Protein detektiert, indem ein Substrat dazugegeben wird. Dies wird von dem Enzym unter Farbentwicklung umgesetzt und die Proteinbanden so angefärbt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass das Substrat lichtempfindlich ist. Es wurden zunächst drei Primärantikörper verwendet, wobei es sich bei anti-HSP und anti-HSC/HSP um monoklonale und bei anti-HSC um einen polyklonalen Antikörper handelte. Da alle drei Antikörper die gleich Sensitivität zeigten, der Kombiantikörper monoklonal war und damit Zeit, Geld und Proteinmaterial gespart werden konnten, wurde für die Untersuchungen nur der Kombiantikörper verwendet.

Mit diesem Antikörper ist HSPA8 (HSC70) bis zu einer Konzentration von **20**  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  und HSPA1A (HSP70) bis zu einer Konzentration von **30**  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  mit der Membralyzer Software (Version 2.5.1) noch gut zu analysieren. Die Software kann Konzentrationen von  $0,16 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  detektieren, das limitierende an dieser Methode ist der Western Blot und die dazugehörige Immundetektion. Dennoch ist diese Software sensitiver als alle kommerziell erhältlichen Verfahren (Modrow et al., noch nicht veröffentlicht)

## 5.2 Formalinstudie

### 5.2.1 Eigenschaften von Formalin

Formalin ist das am häufigsten verwendete Fixierungsmittel in der medizinischen Praxis und Forschung, da es die Gewebestruktur gut erhält und kaum zu Schrumpfung der Gewebe führt. Für diese Arbeit war vorgesehen Gewebe zu nutzen, die in der Gewebebank des Instituts für Rechtsmedizin in Kiel über Jahrzehnte gesammelt wurden. Ein Vorteil wäre gewesen, bestimmte gut beschriebene Erkrankungen und Todesursachen untersuchen zu können. Da Formaldehyd ein proteinvernetzendes Fixativ ist (Lang 2006) war vor Beginn dieser Arbeit in einer systematischen Studie zu klären, ob die Fixierung und die Fixierungsdauer der Gewebe Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat. Damit sollte gewährleistet werden, dass keine falsch-negativen bzw. fälschlich zu niedrigen Ergebnisse generiert werden. Dafür wurden insgesamt 148 Proben aus dem Großhirn und Kleinhirn von sechs Verstorbenen untersucht (siehe 3.3).

### 5.2.2 Proteinanalytik

Aus allen Proben wurden Proteine isoliert, und anschließend photometrisch die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Dabei zeigte sich, dass diese proportional zur Inkubationszeit in Formalin abnimmt. Nach drei Monaten Formalinfixierung war die Gesamtproteinmenge im **Großhirn** um **77 %** und im **Kleinhirn** um **72 %** gesunken. Um methodische Fehler zu minimieren, wurden vier unabhängige Extraktionen durchgeführt und auch die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte aus diesem Grund in Doppelbestimmung.

Für die Abnahme der Gesamtproteinkonzentration mit zunehmender Inkubationszeit in Formalin wurde sowohl für das **Großhirn** als auch für das **Kleinhirn** eine **hohe Signifikanz** ermittelt. Alle Proben wurden zusätzlich immunhistochemisch und mittels des Western Blots untersucht. Hierfür wurden nur bei den eingefrorenen Proben verwertbare Ergebnisse erzielt. Alle Proben, die Formalin fixiert waren, lieferten keine zuverlässigen Ergebnisse bezüglich der Konzentration an HSPA8 und HSPA1A. Dies kann an der geringeren Gesamtproteinkonzentration liegen, da für die Untersuchung immer eine Konzentration von 100 µg /µl eingesetzt wurde und in den meisten Formalinproben Konzentrationen von weniger als 100 µg /µl ermittelt wurden. Deshalb ist davon auszugehen, dass zu wenig

**HSPA8** und **HSPA1A** in der Probe enthalten ist. Dafür spricht auch, dass die Stressproteine unter physiologischen Bedingungen nur zu 5 % (Feige et al., 1994) an der Gesamtproteinmenge einer Zelle beteiligt sind. Unter Stressbedingungen können sie auf 15 % hoch reguliert werden (Lindquist et al., 1988, Welch 1993).

Aus den gefrorenen Proben konnten durchschnittlich **178** µg /µl (GH) / **162** µg /µl (KH) Gesamtprotein isoliert werden. Nach einer Stunde Formalinfixierung lag der Wert in beiden Gehirnbereichen unter **100** µg /µl. Nach längerer Inkubationszeit wurden zum Teil Gesamtproteinkonzentrationen von unter **30** µg /µl isoliert. Da die Nachweisgrenze des Western Blot bei 30 µg /µl für den Nachweis von HSPA8 und HSPA1A liegt, könnte dies ein Grund dafür sein, weshalb die quantitative Bestimmung nicht erfolgreich war.

Zudem ist Formalin ein proteinvernetzendes Fixativ, das die Proteine so verändert, dass die Epitope für die Antikörper nicht mehr erreichbar sind und ein Nachweis mittels Immunodetektion aus diesem Grund nicht mehr möglich ist. Beim immunhistochemischen Nachweis dagegen ist es möglich, durch Hitze induzierte Antigen-Demaskierung (engl. Heat-induced antigen retrieval, Abk. HIAR) die Epitope wieder frei zulegen, so dass die Antikörper binden können (Shi et al., 1991). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch zeigen, ist die Proteinvernetzung durch Formalin nach längerer ( $\geq$  eine Woche) Inkubation nicht vollständig reversibel, so dass die Ergebnisse zunehmend falsch-negativ ausfallen (Abb. 22 und 23).

Trotz Anwendung der sensitiven ABC-Methode wurden nach drei Monaten Formalinfixierung in **58,3** % der Gewebeschnitte sowohl im Großhirngewebe als auch im Kleinhirngewebe falsch-negative Ergebnisse generiert. Dies zeigt, dass auch der immunhistochemische Nachweis bei länger fixierten Geweben keine verlässlichen Ergebnisse liefert (Preusse-Prange et al., noch nicht veröffentlicht)

Alle in der Literatur beschriebenen (Ikeda et al., 1998, Kroll et al., 2008, Fowler et al., 2007) und kommerzielle erhältlichen (Qproteome FFPE Tissue Kit, QIAGEN) Extraktionsmethoden beziehen sich auf Gewebe, die meist nur 18 Stunden maximal 24 Stunden in Formalin fixiert wurden. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Studien längere Fixierungszeiten bei den Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden. Und die Proteinextraktion mit einer der zitierten Methoden bei denen in dieser Arbeit verwendeten Formalinproben mit einer maximalen Fixierungszeit von drei Monaten ebenfalls nicht die gewünschten Resultate geliefert hätten.

### 5.2.2 DNA-Analysen

In dieser Studie wurde neben dem Einfluss des Formalins auf die Proteinanalytik auch die Wirkung auf die DNA untersucht. Um methodische Fehler zu minimieren, wurden alle quantitativen DNA-Analysen in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

In 147 der 148 Gewebeproben wurde nDNA nachgewiesen. Es zeigte sich, dass auch die Konzentration an nDNA in den Proben proportional zur Formalininkubationszeit abnimmt. Nach einer dreimonatigen Inkubation der Gewebe kommt es im Großhirn zu einer

**97,5 %igen** und im Kleinhirn zu einer **86,3 %igen** Abnahme der nDNA-Konzentration im Eluat.

Bei der quantitativen Bestimmung der mtDNA-Kopien in einer Zelle wurden in 142 Proben und beim Nachweis der mitochondrialen 4977bp Deletion in 118 der DNA-Extrakte verwertbare Ergebnisse erzielt. Bei der Auswertung aller mtDNA-Analysen (Formalin- und Pilotstudie) wurden nur Ergebnisse vor  $\geq 1.000.000$  Kopien mtDNA in einem Extrakt und einem prozentualen Wert  $\geq 0,0001$  % für die 4977bp Deletion der mtDNA berücksichtigt. Damit ist gewährleistet, dass falsch-negative Ergebnisse nicht in die Auswertung einfließen, da eine Anzahl von weniger als 1.000.000 Kopien nicht ausreicht, um eine Deletion mit einem prozentualen Wert von 0,0001 % zu detektieren.

Es zeigte sich, dass auch die Anzahl an mtDNA-Kopien in einer Zelle proportional zur Formalininkubationszeit abnimmt. Nach drei Monaten Formalinfixierung wurden im **Großhirn** mit 570 mtDNA-Kopien /Zelle lediglich **3,7 %** und im **Kleinhirn** mit 3065,15 mtDNA-Kopien /Zelle nur **17,1 %** der ursprünglichen Kopienzahl nachgewiesen.

Der prozentuale Anteil der dmtDNA<sup>4977</sup> an der mtDNA nimmt mit längerer Inkubation der Gewebe in Formalin proportional ab, jedoch deutlich stärker als die mtDNA-Kopien / Zelle. Dies bedeutet, dass die Relation zwischen den mtDNA-Kopien / Zelle und dmtDNA<sup>4977</sup> nicht mehr stimmt und sich für den prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> zu niedrige Werte ergeben. Dadurch sind keine Rückschlüsse bezüglich des Ausmaßes an Schädigung der mtDNA im Gewebe möglich.

Bei allen DNA-Analysen kann der Rückgang bezogen auf die Inkubationszeit als **signifikant** gewertet werden (P-Value-Werte Tab.13). Formalin führt nicht nur zu Protein-Protein-Vernetzungen, vielmehr führt es auch zu einer Protein-DNA-Quervernetzung. Bei längerer Lagerung der Gewebe in Formalin und durch Sonnenlicht kann es zusätzlich zur Bildung von Ameisensäure kommen, welche die DNA hydrolysiert (Lang 2006).

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Arbeitsgruppen (Savioz et al., 1997, Legrand et al., 2002, Gilbert et al., 2007, Fowler et al., 2007) zeigen, wird es mit längerer Fixierungszeit immer schwieriger, nicht degradierte DNA zu isolieren. Es ist aber noch möglich. Jedoch ist die Quantität und Qualität gegenüber den nicht behandelten Proben deutlich geringer, so dass die erhaltenen Werte stark verfälscht sind und keine Aussage bezüglich der realen DNA-Konzentrationen in den Geweben getroffen werden kann.

In der Abbildung 28 ist der prozentuale Anteil der dmtDNA<sup>4977</sup> an der mtDNA im Mittel in den einzelnen Geweben dargestellt. Es fällt auf, dass die Werte im Bereich zwischen 1 Stunde und 12 Stunden stark schwanken. Wenn davon ausgegangen wird, dass Formalin eine Eindringgeschwindigkeit von 1 mm / Std. (Lang 2006), wurde bei den verwendeten Gewebestücke (ca. 11 x 11 mm) eine vollständige Fixierung erst nach 12 Stunden erreicht. Es ist möglich, dass beim Zuschnitt der Gewebe (1 Std. - 10 Std.) zum Teil Bereiche ausgewählt wurden, die noch nicht fixiert und in denen die DNA noch nicht geschädigt war. Folglich wurden höhere Konzentrationen als in den anderen Geweben ermittelt.

Da die genaue Fixierungsdauer der Proben aus der Gewebebank nicht bekannt war und zusätzlich ungepuffertes Formalin verwendet wurde, wurden in dieser Arbeit nur unfixierte Gewebe für die weiteren Untersuchungen verwendet, die bei -80°C bis zur Analyse eingefrorenen waren.

Abschließend ist zu sagen, dass bei der Analyse von formalinfixiertem Gewebe die Fixierungsdauer sowie die Konzentration der Fixierlösung nicht außer Acht gelassen werden dürfen (Ferrer et al., 2007) und alle erzielten Ergebnisse kritisch hinterfragt werden müssen. Ferner sollte darauf geachtet werden, dass nur gleichbehandelte Proben (Fixierungszeit und Konzentration) verwendet werden.

### **5.3 Altersabhängigkeit**

In dieser Arbeit wurden das Großhirn und das Kleinhirn Verstorbener verschiedener Altersstufen untersucht, genauer die nervenzellreiche graue Substanz (Rinde) und die weiße Substanz, die überwiegend aus Nervenfasern besteht. Diese Schichten konnten makroskopisch gut unterschieden werden, wodurch der Zuschnitt der Gewebeproben erleichtert wurde.

### 5.3.1 Proteinanalyse

Die Bildung von Stressproteinen und deren Funktion ist eng gekoppelt mit dem Überleben der Zelle; speziell die Mitglieder der HSPA-Familie. Besonders das im Cytoplasma konstitutiv vorkommende HSPA8 (früher HSC70) und das induzierbare HSPA1A (früher HSP70) spielen hier eine entscheidende Rolle (Landry et al., 1982, Li et al., 1982, Johnston et al., 1988, Riabowol et al., 1988). Unter physiologischen Bedingungen erfüllt HSPA8 seine zahlreichen Chaperon-Funktionen und unter Stressbedingungen verhindert es die Aggregation von Proteinen (Lindquist et al., 1988, Bukau et al., 2006). Da HSPA1A unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Mengen gebildet wird, kann dessen vermehrte Bildung als Indikator für Zellstress genutzt werden (Calderwood et al., 2008, Schmitt et al., 2007).

Aus diesem Grund wurde aus allen Proben Gesamtprotein extrahiert und in jeder Probe der Gehalt an HSPA8 und HSPA1A bestimmt. Dabei fiel auf, dass nur in den 200 Rindenproben des Groß- und Kleinhirns die beiden Proteine mittels des Western Blot quantitativ nachgewiesen wurden. Aufgrund der zellulären Struktur der Markbereiche ist davon auszugehen, dass eventuell vorhandene Stressproteine nur in Konzentrationen vorliegen, die unterhalb der Nachweisgrenze des Analysesystems (Western Blot und Membralyzer Software) liegen. Im **Großhirn** wurde im Mittel eine HSPA8-Konzentration von **9,46** µg Protein / µl Extrakt und im **Kleinhirn** mit einer mittleren Konzentration von **13,7** µg HSPA8 / µl Extrakt gut **31** % mehr detektiert.

Dies spricht dafür, dass das Chaperonsystem im Kleinhirn unter physiologischen Bedingungen ausgeprägter ist als im Großhirn, da die Konzentration an konstitutivem Protein deutlich höher ist. Da das Kleinhirn essentielle Prozesse wie den Herzschlag, den Atemreflex und die Muskelbewegungen steuert, sollten die Schutzmechanismen entsprechend stärker ausgebildet sein.

Gegen eine Vermehrung aufgrund eines Zellstressses spricht, dass die Mengen der induzierten Form in beiden Gehirnbereichen etwa gleich sind. Ferner entspricht der Wert des HSPA1A einem Anteil von 2,6 % an der Gesamtproteinmenge im Großhirn bzw. 2,7 % im Kleinhirn den Mengen an induzierten Stressproteinen, die in der Literatur beschrieben sind (Di Domenico et al., 2010, Günther et al., 1994, Feige et al., 1994).

Es zeigte sich, dass in den beiden untersuchten **Gehirnbereichen** die Konzentration an HSPA8 mit steigendem Alter proportional zunimmt. Diese ist sowohl im **Großhirn** mit einem

P-Value von  $7,249 \times 10^{-33}$  als auch im Kleinhirn (P-Value von  $1,448 \times 10^{-31}$ ) als **hochsignifikant** zu werten. Für das induzierte Protein wurden im Großhirn und Kleinhirn im Mittel mit  $5,31 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  und  $5,35 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  nahezu identische Konzentrationen detektiert. Auch hier ergeben sich bezogen auf die Korrelation zwischen der HSPA1A-Konzentration und dem erreichten Lebensalter der Verstorbenen Werte, die als **hochsignifikant** einzustufen sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Konzentrationen der beiden untersuchten Stressproteine mit steigendem Lebensalter zunehmen. In verschiedenen Veröffentlichungen wurden unterschiedliche Gewebe wie z. B. Serum / Lymphozyten (Jin et al., 2004), Skelettmuskel (Locke 2000) und Herz (Locke et al., 1996) auf eine Korrelation zwischen der Stressantwort und dem Alter der Individuen hin untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in allen untersuchten Geweben aus den Studien eine Abnahme mit steigendem Alter nachgewiesen. Da das Gehirn als zentrales Steuerorgan des Körpers fungiert, ist es nicht auszuschließen, dass es auch im Alter durch Mechanismen (Stressantwort) geschützt ist, die in anderen Organen mit zunehmendem Alter an Funktionalität verlieren. Zudem konnten u. a. (Calabrese et al., 2002) dokumentieren, dass die Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle bei der Differenzierung neuronaler Zellen spielen. Dafür spricht auch, dass es bei Menschen, bei denen die Mitglieder der HSPA-Familie im Gehirn ihre Chaperon-Funktion nicht richtig ausführen, zur Ausbildung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. Alzheimer oder Morbus Parkinson kommt (Calabrese et al., 2007). Da aber nicht alle älteren Menschen an diesen Krankheiten leiden, muss der Schutz im Gehirn auch im Alter weiter aufrechterhalten werden. Stressproteine, besonders die Mitglieder der HSPA-Familie, haben generell eine neuroprotektive Funktion im menschlichen Gehirn (Kelly et al., 2002). Weitere Untersuchungen in diese Richtung wären sinnvoll, um die Unterschiede in den verschiedenen Geweben zu verifizieren.

## 5.3.2 DNA-Analyse

### 5.3.2.1 nDNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels quantitativer Realtime-PCR die Konzentration an nuklärer DNA in den Proben ermittelt. Dabei wurde in allen untersuchten Proben aus dem Markbereich des Kleinhirns nDNA isoliert. Bei neun Proben (sechs Großhirn, zwei Kleinhirn) aus dem Rindbereich und einer Probe aus dem Markbereich des Großhirns konnte dagegen keine nDNA nachgewiesen werden. Diese zehn Proben wurden bei der Beurteilung aller DNA-Analyse Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kommt es in allen untersuchten Gehirnbereichen zu einem Anstieg der nDNA-Konzentration mit steigendem Alter. Bei der statistischen Betrachtung ergeben sich für alle Gehirnbereiche P-Value-Werte mit einer Korrelation zwischen der nDNA-Konzentration und dem erreichten Lebensalter der Verstorbenen, die als **hochsignifikant** zu werten sind.

Dabei können methodische Gründe für diesen altersbedingten Anstieg ausgeschlossen werden. Die Sammlung der Proben erfolgte chronologisch, nach der vom Institut vergebenen, fortlaufenden Sektionsnummer. So wurden immer die Proben der letzten zwölf Obduktionen zusammen extrahiert. Entsprechend gab es gemischte Altersverteilungen. Zudem war das Lebensalter während der Aufarbeitung nicht bekannt. So konnte ein persönlicher Bias z. B., dass bei älteren Verstorbenen und unbewusst mehr Gewebe entnommen wurde, vermieden werden.

Ein möglicher Grund für die Zunahme der nDNA-Konzentration könnte sein, dass ältere neuronale Zellen ausgeprägtere DNA-Reparatur-Mechanismen haben und geschädigte DNA eher repariert und die Zelle nicht abgebaut wird, dies wiederum führt zu einem Anstieg der Zellzahl. Dadurch ist die Zellzahl in einer bestimmten Menge an Gewebe höher und somit auch der Gehalt an DNA. Während jüngere neuronale Zelle dazu neigen, eher die Zellen mit der geschädigten DNA abzubauen, da die Reparatur-Mechanismen noch nicht so ausgebildet sind (Romero et al., 2003, Geller et al., 2001).

### 5.3.2.2 mtDNA / dmtDNA<sup>4977</sup>

Neben der nDNA wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Anzahl an mtDNA-Kopien / Zelle und die Kopienanzahl mit der 4977 bp Deletion der mtDNA mit Hilfe einer Duplex-Realtime-PCR bestimmt. In allen untersuchten Proben mit Ausnahme einer Probe aus dem Kleinhirnrindbereich wurde mitochondriale DNA nachgewiesen.

Die 4977 bp Deletion der mtDNA wurde in drei der untersuchten Bereiche (Großhirnrinde, Großhirn und Kleinhirn Mark) in **48 % - 69 %** der Proben nachgewiesen, im **Rindbereich** des **Kleinhirns** fand sich lediglich in **39 %** der Proben dmtDNA<sup>4977</sup>. Da das Kleinhirn nur ca. 10 % des Gehirnvolumens einnimmt, aber in ihm ca. 50 % der Gehirnneurone lokalisiert sind, müsste der Energiebedarf sehr hoch sein. Somit wäre zu erwarten, dass im Kleinhirn ein hoher Gehalt an mtDNA sowie eine starke Schädigung, d.h. eine hohe dmtDNA<sup>4977</sup> Konzentration, nachgewiesen wird.

Es zeigte sich, dass die Anzahl an mtDNA-Kopien in einer Zelle in der **Großhirnrinde** im Alter marginal zurückgeht und in der **Kleinhirnrinde** dagegen ansteigt. In den **Mark-Bereichen** ergibt sich ein gegensätzliches Bild.

Wenn die Anzahl an mtDNA-Kopien /Zelle und der prozentuale Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> zusammen betrachtet werden, fällt auf, dass in der Großhirnrinde im Alter kein Anstieg an mtDNA-Kopien / Zelle zu verzeichnen ist und dieser Gewebereich den höchsten prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> (0,24 %) aufweist. In der Kleinhirnrinde zeigt sich das umgekehrte Bild. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in der Kleinhirnrinde zum Schutz des Gewebes im Alter mehr mtDNA gebildet wird, um so die Schädigungen durch Deletionen zu kompensieren. Dies scheint in der Großhirnrinde nicht der Fall zu sein (Reynier et al., 1995).

Die in dieser Arbeit gefundene Korrelation zwischen dem erreichten Lebensalter der Verstorbenen und dem prozentuale Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> an der Gesamt-mtDNA des Gehirns steht mit Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen in Einklang, die diesen Zusammenhang auch in anderen Geweben gefunden haben (von Wurmb-Schwark et al., 2010, Meissner et al., 1999, Lee et al., 1994).

So konnten Li et al. (Li et al., 2006) beobachten, dass es ab dem 20. Lebensjahr i. d. R. zu einem Anstieg der Menge an spezifisch deletierter mtDNA kommt. Der Anstieg ist zu diesem Zeitpunkt bereits im Skelettmuskel nachweisbar und kann bei einem Alter von über 70

Jahren einen Prozentsatz von bis zu 0,14 % und mehr erreichen (Meissner et al., 1997, Corral-Debrinski et al., 1992).

Es bestehen Unterschiede bezüglich der Deletionsrate in den verschiedenen Gehirnarealen. So lassen sich im Putamen und der Substantia nigra hohe Mengen nachweisen, während das Gewebe des Kleinhirns nur geringe Deletionsraten aufweist. Dies steht möglicherweise in Zusammenhang mit der metabolischen Aktivität des jeweiligen Gehirnbereichs (Arnheim et al., 1992, Schwark et al., 1998).

Desweiteren weisen auch die graue und die weiße Substanz Unterschiede im prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> auf. Soong et al., konnten nachweisen, dass die graue Substanz eine höhere Deletionsrate aufweist als die weiße. Somit wird davon ausgegangen, dass die Mutationen nicht in den Nervenfasern, sondern in den Nervenzellen auftreten. Da nur die graue Substanz Perikaryen in großer Anzahl enthält, während die weiße Substanz keine hat. In den Perikaryen findet eine ausgeprägte Proteinbiosynthese statt und somit kommen auch die Mitochondrien (Energieförderer) in hoher Anzahl vor (Trepel 2008).

Abschließend ist zu sagen, dass zwischen dem Lebensalter und den verschiedenen untersuchten Parametern der DNA eine signifikante Korrelation besteht.

### **5.4 Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> und der Konzentration an HSPA8 / HSPA1A unter Berücksichtigung der Todesursache**

In der rechtsmedizinischen Praxis hat die Untersuchung von Proteinen als Biomarker bei bestimmten Fragestellungen wie z. B. bei der Wundalterbestimmung oder bei der Todesursachenklärung an Bedeutung zugenommen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zusätzlich zu der mtDNA und der 4977 bp Deletion der mtDNA auch die beiden Stressproteine HSPA8 und HSPA1A als Indikatoren für Zellstress ausgewählt. Ferner sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob ein Anstieg der Hitzeschockproteine eine Schädigung der Zelle verhindert?

Um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> und der Konzentration an HSPA8 / HSPA1A in Zusammenhang mit der Todesursache besteht, wurden nur die Ergebnisse aus den Rindengebieten herangezogen, da im Mark keine Stressproteine nachweisbar waren.

## Diskussion

Laut eines Berichts des Statistischen Bundesamtes vom 23.09.2011 war im Jahre 2010 die häufigste Todesursache mit **41,1** % in Deutschland eine Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen diesbezüglich ein ähnliches Bild. Bei Betrachtung der jeweils zehn höchsten Werte (insgesamt 39 Proben) jedes untersuchten Parameters zeigt sich, dass **38** % der Verstorbenen in Folge einer einer Herzerkrankung, **13** % aufgrund einer Hypoxie, **10** % an einer Hyperthermie und **8** % nach einer Intoxikation verstorben sind. Ferner fiel auf, dass bei **23** % der untersuchten Verstorbenen mit einem oder mehr erhöhten Parametern ein chronischer Alkoholabusus vorlag. Da es sich um ein forensisches Probenkollektiv handelt, bei dem statistisch betrachtet, der Prozentsatz an unnatürlichen Todesarten überwiegt, sind die Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf die deutsche Gesamtbevölkerung übertragbar. Bezogen auf forensische Fragestellungen handelt es sich jedoch um eine Normalverteilung.

Ferner ist aus den Werten ersichtlich, dass wenn die mtDNA-Kopien in einer Zelle erhöht sind, der prozentuale Anteil an dmtDNA<sup>4977</sup> vermindert ist. Lediglich in zwei Proben war dies nicht zutreffend. Die beiden Personen (G016 / G076, siehe Tab. ) sind an einer Erkrankung des Herzes verstorben und waren beide über 50 Jahre alt. Nicht nur bei diesen beiden Proben, sondern auch bei über der Hälfte der Proben darf das relativ hohe Lebensalter (im Mittel 57 Jahre) bei der Beurteilung der Ergebnisse für die 4977 bp Deletion nicht außer Acht gelassen werden. Die höchsten Werte für die Deletion im Großhirn wurde in den Proben G089 (Hyperthermie) und G026 (Alkoholabusus) ermittelt. Während für Probe G089 nur 317 Kopien an Wildtyp mtDNA und für Probe G026 2314 Kopien nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein niedriger Wert für die Deletion nicht heißen muss, dass die Zellen keinem Zellestress ausgesetzt waren. Aus diesem Grund ist es sinnvoll die Ergebnisse der Deletion immer mit denen der Wildtyp mtDNA-Kopien in Beziehung zu setzen, da Schäden in den Geweben (vor allem im Kleinhirn) durch eine erhöhte Anzahl an mtDNA in den Zellen kompensiert werden könnten (Bai et al., 2005). Hinsichtlich der untersuchten Stressproteine HSPA8 und HSPA1A wurde festgestellt, dass in **61** % der Fälle, in den erhöhte Proteinwerte gemessen wurden, beide Stressproteine erhöht waren. Dabei war kein Unterschied zwischen dem Großhirn und dem Kleinhirn festzustellen. Ferner wurde kein Unterschied zwischen den beiden Proteinen festgestellt. Es zeigte sich aber, dass bei **39** % der Proben neben den Stressproteinen mindestens ein weiterer Parameter (mtDNA oder dmtDNA<sup>4977</sup>) erhöht war.

## Diskussion

Bezogen auf die Todesursachen und die vier untersuchten Parameter wurde festgestellt, dass bei Herzerkrankungen, chronischem Alkoholabusus, Hypoxie und Hyperthermie alle Parameter im Mittel erhöht sind. Da das Probenkontingent nur eine beschränkte Probenanzahl und eine hohe Variabilität in Bezug auf die Todesursachen aufwies, wären Untersuchungen mit weiterführenden Fragestellungen bzw. mit größeren Probenkontingenten sinnvoll.

Da in der Literatur noch keine Untersuchung beschrieben ist, in der alle vier Parameter gleichzeitig untersucht wurden, gibt es keine Referenzwerte für die Ergebnisse dieser Arbeit. Als erste ihrer Art weist sie eine Beziehung zwischen mtDNA und den Stressproteinen nach. Die Erkenntnisse dieser Arbeit, d.h. die Korrelation zwischen den vier Parametern, besonders jedoch die Beziehung zwischen den Proteinen und der dmtDNA<sup>4977</sup> sollten in weiteren Studien zur Verifizierung der Ergebnisse genauer untersucht werden. Auf die Frage, ob sich die ausgewählten Stressproteine als Biomarker in der Forensik eignen, kann geantwortet werden, dass die Untersuchung dieser Proteine zusätzliche wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der Todesursache liefert und so der Todesursachenermittlung dienlich sein kann. Da die dmtDNA<sup>4977</sup> in der Regel als Langzeitfolge bei chronischen Erkrankungen (> 6 Stunden) auftritt und die Stressproteine als Teil der angeborenen Immunreaktion sofort reagieren (0 – 6 Stunden) (Munk 2000) könnte eine Untersuchung der beiden Parameter Aufschluss darüber geben, ob es sich um eine akute Stresssituation handelte oder eine chronische.

## 6 Zusammenfassung

Die Stressproteinsynthese gilt als eine der relevanten zellulären Antworten auf Stressoren. Die HSP wirken der Zellschädigung durch Fehlfaltung oder Aggregation der Proteine entgegen, indem sie sich an diese binden und das Protein wieder in seine ursprüngliche Form zurückführen oder dafür Sorge tragen, dass falsch gefaltete Proteine abgebaut werden (Munk 2000). Diese sogenannte Chaperonfunktion ist charakteristisch für die Mitglieder der HSPA-Familie.

Auch der Erhalt der genetischen Information ist für das Überleben der Zelle wichtig.

Hier existieren diverse spezifische DNA-Reparaturmechanismen, die allerdings keinen absoluten Schutz vor Schädigungen bieten. So entstehen verschiedene DNA-Veränderungen, die als Marker für zellspezifischen Stress angesehen werden können. Davon ist insbesondere die mitochondriale DNA betroffen.

In der Arbeit wurde untersucht, inwieweit ein Einfluss verschiedener, potentiell schädlicher Faktoren auf der Protein-Ebene und der genetischen Ebene nachzuweisen ist. Es stellte sich die Frage, ob bestimmte Veränderungen in einem forensischen Kontext z. B. zur Klärung der Todesursache eingesetzt werden können.

Mit denen im ersten Teil der Arbeit etablierten und validierten Proteinanalysemethoden standen adäquate Nachweismethoden für die bestmögliche qualitative und quantitative Analyse der beiden Proteine **HSPA8** (konstitutive Form) und **HSPA1A** (induzierte Form) zur Verfügung. Im Weiteren wurden diese neu etablierten Methoden auf ihre Eignung für die weiteren Analysen getestet. Daraus entwickelte sich die Fragestellung, inwieweit die Ergebnisse aus frischem Material identisch mit denen aus formalinfixierten Geweben sind oder ob es durch die Fixierung zu verfälschten Ergebnissen kommt?

Um dies zu klären, wurden insgesamt 148 Proben mit verschiedenen Inkubationszeiten untersucht. Es zeigte sich, dass die Dauer der Formalinfixierung einen erheblichen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat. Bei der Gesamtproteinmenge kam es zu einer Abnahme von bis zu 77 % nach drei Monaten Fixierung. Im histologischen Schnitt war ähnlich wie bei der Gesamtproteinmenge zu beobachten, dass die Nachweisbarkeit der Proteine proportional zur Fixierungsdauer abnahm. Das gleiche Bild zeigte sich für die drei genetischen Parameter (nDNA, mtDNA und dmtDNA<sup>4977</sup>). Alle Werte nahmen proportional

## Zusammenfassung

zur Fixierungsdauer ab. Dies verdeutlicht, welchen starken Einfluss Formalin auf die Ergebnisse hat und dass bei der Analyse von formalinfixiertem Gewebe die Fixierungsdauer sowie die Konzentration der Fixierlösung nicht außer Acht gelassen werden darf (Ferrer et al., 2007). Ferner sollten alle Ergebnisse kritisch in Hinblick auf eventuell zu niedrige Messwert als Folge der Formalinfixierung hinterfragt werden.

Die Resultate aus dem zweiten Teil führten dazu, dass im dritten Teil der Arbeit, der Pilotstudie, nur bei -80°C eingefrorenes, unfixiertes Gewebe für die Untersuchungen verwendet wurde. Aus der forensischen Praxis wurden hierfür 100 Gewebeproben (Großhirn und Kleinhirn) analysiert. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Frage, inwieweit verschiedene äußere Faktoren wie z.B. Hitze, Kälte und Sauerstoffmangel, die auch todesursächlich sein können, einen direkten Einfluss auf die genannten Makromoleküle im Hirngewebe haben? Außerdem sollte geklärt werden, ob spezifische Abweichungen wie die Expression von Stressproteinen oder die Akkumulation mitochondrialer Veränderungen als Zellmarker für diese Stressoren angesehen werden können?

Im Rahmen dieser Studie wurde für alle untersuchten Messgrößen eine signifikante Korrelation mit dem Alter festgestellt, d.h. sowohl die beiden Proteine HSPA8 und HSPA1A, als auch die genetischen Marker nDNA, Wildtyp mtDNA und der prozentuale Anteil der 4977 bp Deletion an der gesamten mtDNA nehmen mit steigendem erreichten Lebensalter zu.

Bei der Betrachtung der vier Parameter bezüglich der Todesursache zeigten sich in Fällen mit Herzerkrankungen, chronischem Alkoholabusus, Hypoxie und Hyperthermie signifikant höhere Werte als bei anderen Todesursachen.

Da erstmals die Untersuchung von nDNA, mtDNA, dmtDNA<sup>4977</sup> und den beiden Stressproteinen gleichzeitig erfolgte, finden sich keine Referenzwerte in der Literatur. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die ausgewählten Stressproteine und die dmtDNA<sup>4977</sup> als Biomarker in der Forensik geeignet sind, da die Untersuchung zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Todesursache liefern können. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit können somit bei der Todesursachenermittlung dienlich sein. Zur Komplettierung der Ergebnisse sollten weitere Studien angeschlossen werden.

## 7 Summary

The stress protein synthesis is one of the most important cellular responses to stressors. Specific stress proteins (HSP for heat shock protein) counteract cell damage caused by misfolding or aggregation of proteins by binding to them so that the protein is able to switch back to its original form or could be neutralized by degradation (Munk 2000). This so-called chaperone function is characteristic of the members of the HSPA family. Along with the preservation of the genetic information it is essential for the survival of the cell. There are several specific DNA repair mechanisms which, however, do not provide total protection against damage. This leads to DNA alterations which may be regarded as a marker for cell-specific stress. In particular the mitochondrial DNA is more affected of these stressors because of the loss of most of these repair mechanisms.

The aim of this study was to analyze the influence of different, potentially harmful factors on the protein and the genetic level. It raised the question whether certain changes can be used as an indicator to clarify the cause of death in forensic contexts. The first part was to develop and validate an analytical method to detect the proteins adequately. It could be proved that these methods were the most efficient qualitative and quantitative analysis for the detection of HSPA8 (constitutive form) and HSPA1A (induced form).

In addition these newly-established methods are tested for their suitability for further analysis. The aim of this study was to prove if the results of fresh material are identical to those of formalin-fixed tissues or if a degradation could be verified. The results show a significant association of the lack of the protein concentration in the tissue and the duration of formalin fixation (up to 77% lack after three months incubation). These results could be confirmed using histochemically methods.

The same picture emerged for the three genetic parameters (nDNA, mtDNA and dmtDNA4977). All values decreased proportionally to the period of fixation. This illustrates the huge influence that formalin has on the results and that the analysis of formalin tissue fixation duration and concentration of fixative should not be ignored (Ferrer et al., 2007). Additionally, all results are critically analyzed. This meant that in the third part of the work, only unfixed tissues stored at -80 °C were used for this pilot study. An amount of 100 samples (cerebrum and cerebellum), collected during the forensic routine procedures, were

## Zusammenfassung

analyzed. It was the main question how many different factors, including death causing factors such as heat, cold or lack of oxygen, have an direct influence on the mentioned macromolecules in brain tissues.

It should also be clarified whether specific changes such as the expression of stress proteins or the accumulation of mitochondrial changes as a cell marker can be considered for these stressors? This study shows a significant correlation between the investigated parameters and the lifespan of the deceased persons.

I.e. both the two proteins HSPA8 and HSPA1A, as well as the genetic markers nDNA, wild type mtDNA and the percental amount of the 4977 bp deletion at the total mtDNA increase with increasing Lifespan of the deceased persons. All four parameters show an significant increase related to causes of death such as heart disease .. in comparison to other causes of death. Cases with heart disease, chronic alcohol abuse, hypoxia and hyperthermia were significantly higher than for other causes of death. It's the first time all these four parameters (nDNA, mtDNA, dmtDNA<sup>4977</sup> and the two stress proteins) were investigated and related to each other. There are no reference values available in the literature. This study demonstrates that the selected two stress proteins and the dmtDNA<sup>4977</sup> could be used as a valuable biomarkers in forensic caseworks especially regarding additional information regarding the cause of death. The findings can be used in determining the cause of death as a supporting tool. To verify and validate these results further studies should follow up.

## 8 Ausblick

Da das Probenkontingent, das für die Pilotstudie zur Verfügung stand, nur eine beschränkte Probenanzahl und eine hohe Variabilität in Bezug auf die Todesursachen aufwies, wäre es sinnvoll anschließende Untersuchungen mit ergänzenden Fragestellungen bzw. mit Probenkontingenten in denen alle Todesursachen ungefähr gleich häufig auftreten, durchzuführen. So könnte eine höhere statistische Signifikanz erzielt werden.

Zusätzlich sollte auch ein besonderes Augenmerk auf die eventuell bestehende Korrelation von dmtDNA<sup>4977</sup> und mtDNA-Kopien zur Konzentration an konstitutivem und induziertem Stressprotein gelegt werden.

Bezüglich der Zunahme der beiden Stressproteine mit steigendem Alter und der widersprüchlichen Ergebnisse aus der Literatur sollte eine Vergleichsstudie durchgeführt werden, in der neben Gehirngewebe andere Gewebe z. B. von Niere, Herz und Blut mit den gleichen Methoden untersucht werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass für jede Altersgruppe die gleiche Anzahl an zu untersuchenden Personen gewählt wird.

Ferner sollte anhand eines größeren Kollektivs von Proben von Verstorbenen mit Herzkreislauferkrankungen, Hypoxie und chronischem Alkoholismus die Korrelation zwischen den vier Parametern genauer untersucht werden.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin Triphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid (säure)
DNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
et al.	et alteri
fg	Femtogramm
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HE-Färbung	Hämotoxylin-Eosin Färbung
Hsc	Heat shock cognate (constitutive)
HSP	Hitzeschockprotein
kDa	Kilo Dalton
M	molar

## Anhang

mA	Milliampère
maennl.	männlich
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min.	Min.
mitoch.	mitochondrial
ml	Milliliter
mol	Mol
mtDNA	mitochondriale DNA
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
nDNA	nukleäre DNA
ng	Nanogramm
PCR	Polymerasechainreaction (Polymerasekettenreaktion)
pg	Pikogramm
rfu	relative Fluoreszenzeinheiten
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
rmp	rotation per minute
Sek.	Sekunde
sog.	so genannte
spp	Subspezies
STR	Short tandem repeat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris/HCl-NaCl-Puffer
TE	Tris/HCl-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMAC	Tetramethylamoniumchlorid
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRIS-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TTBS	Tris/HCl-NaCl-Puffer
U	Uracil
u. ä.	und ähnliche

u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolettes-Licht
V	Volt
weibl.	weiblich
z. B.	zum Beispiel

## 9.2 Reagenzien und Chemikalien

6-Aminohexansäure, ROTH

Albumin Fraktion V, ROTH

Amidoschwarz, ROTH

Ammoniumpersulfat (APS), MERCK

Ammoniumsulfat, MERCK

Brilliant Blau R250, SERVA

Bromphenolblau, SERVA

Dimethylsulfoxid (DMSO), QBIOGENE

DNA-Exitus-Plus™; AppliChem GmbH

DNA-Extraktion: Spin Tissue mini, STRATEC Molecular GmbH

dNTPs Mix 2,5 mM each, BIOLINE

EDTA, Fermentas

Essigsäure (100 %, Eisessig), MERCK

Ethanol (99 % Ethylalkohol) rein, J.T. BAKER

Ethanol (99 % Ethylalkohol) vergällt, BÜFA CHEMIKALIEN GmbH

Formaldehyd (37 %), ROTH

Formalin 4,5 %, BÜFA CHEMIKALIEN GmbH

Glycerol, MERCK

Glycin, MERCK

Hämalaun, ROTH

HCL, MERCK

HPLC Wasser, J.T.BAKER

Immolase DNA-Polymerase (5 u / µl), BIOLINE

ImmuChem Immunhistochemistry (IHC) Kit, BIOCHAIN

## Anhang

ImmunoBuffer 10 x, BIOLINE  
β-Mercaptoethanol, MERCK  
Methanol, ROTH  
MgCl<sub>2</sub> (50 mM), BIOLINE  
Milchpulver, ROTH  
N,N,N',N'-Tetramethylethyldianin (TEMED), SERVA  
Natriumcarbonat, MERCK  
Natriumchlorid, MERCK  
Natriumcitrat, MERCK  
Natriumdesoxycholat, ROTH  
Natriumhydroxid, MERCK  
Natriumorthovanadat, APPLICHEM  
Natriumthiosulfat-Pentahydrat, MERCK  
o-Phosphorsäure, ROTH  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), ROTH  
Precision Plus Protein™ Dual Xtra, BIO RAD™  
Primärantikörper Anti HSC70, STRESSMARQ  
Primärantikörper Anti HSP70 (Klone: C92F3A-5), STRESSMARQ  
Primärantikörper Anti HSP70/HSC70 (Klone: N27F3-4), STRESSMARQ  
Primer del L35/H45, FAM markiert; BIOMERS  
Primer Telo 98 F, BIOMERS  
Primer Telo 98 R, BIOMERS  
Primer wt L15/H16, FAM markiert; BIOMERS  
2-Propanol, ROTH  
ProteoBlock™ Protease Inhibitor Cocktail, FERMENTAS  
Roti®-Blue 5 x Konzentrat, ROTH  
Roti®-Mark 10-150 PLUS, ROTH  
Roti®-QUANT universal, ROTH  
Roticlear®, ROTH  
Rotiphorese® 10 x SDS-PAGE, ROTH  
Rotiphorese® Gel 30 (37,5 : 1), ROTH  
SDS, FLUKA

## Anhang

Sekundär-Antikörper Anti-Mouse, PROMEGA

Sekundär-Antikörper Anti-Rabbit, PROMEGA

Silbernitrat, MERCK

Sonde del, VIC markiert; BIOMERS

Sonde telo, NED markiert; BIOMERS

Sonde wt, FAM markiert; BIOMERS

TE-Puffer (Tris-HCl Lsg., EDTA, Aqua dest.)

Tris - Base, Serva

Tris-HCl, ROTH

Triton X 100, ROTH

Tween 20, MERCK

Wasserstoffperoxid, Merck

Western Blue®, PROMEGA

Zitronensäure, MERCK

### 9.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Acer Aspire 5940 G

Adhäsive qPCR – Folie, SARSTEDT

Applied Biosystems™ 7300 RT-PCR System, LIFE TECHNOLOGIES

Axio Cam HR, ZEISS

Axio Vision Rel.4.5 Software, ZEISS

Axiophot (Fotomikroskop), ZEISS

Centrifuge 5424, EPPENDORF AG

DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR, G. KISKER GBR PRODUKTE FÜR DIE BIOTECHNOLOGIE

EBU – 4000; C.B.S. SCIENTIFIC CO.

Einmalpipette (Plastik), 5 ml; ROTH

Elektrophoresis Power Supply ST 304, GIBCO BRL

Färbeeinsätze, ROTH

Feuchtekammer, LKB BROMMA

Filterpapier, ROTH

Glasküvetten, ROTH

## Anhang

Glasplatten, BIORAD

Heraeus Multifuge X1R, THERMO SCIENTIFIC

Kühlplatte Kryofix, Enovit

Homogenisator, 2 ml; SCHMIDT LABORBEDARF GMBH

Major Science MP – 500 V; BIOSTEP®

Mikroskop, ZEISS

Mikrowelle 800, SEVERIN

Mini Protean® Glass Plates Short Plates; Bio RAD™

Mini Protean® Glass Plates Spacer Plates (1 mm Spacer); Bio RAD™

Mini Protean® Tetra Cell; Bio RAD™

Minizentrifuge, Sprout™; G. KISKER GBR PRODUKTE FÜR DIE BIOTECHNOLOGIE

Objektträger Super Frost Plus (beschichtet), MENZEL

Petrischale 90 mm (Plastik); MERCK

Photometer smart Spec plus, BIO-RAD

Pinzetten, ROTH

Pipetten (verschiedene Größen), EPPENDORF

Pipetten (verschiedene Größen), ROTH

Pipettenspitzen (verschiedene Größen), BIOZYM

Pipettenspitzen, gestopft (verschiedene Größen), BIOZYM

Plastikküvetten, ROTH

Plastikkassetten, KABE Labortechnik

Präzisionswischtücher, Kimtech Science, KIMBERLY-CLARK® WORLDWIDE INC.

PVDF-Membran; ROTH

Reaktionsgefäße 0,5 ml; SARSTEDT AG & CO.

Reaktionsgefäße 1,5 ml, SARSTEDT AG & CO

Reaktionsgefäße 2,0 ml, SARSTEDT AG & CO

Scanner CanoScan4400F, CANON

Schlittenmirkotom, JUNG

Schraubverschluss-Röhrchen, 15 ml; GREINER BIO-ONE

Schraubverschluss-Röhrchen, 50 ml; GREINER BIO-ONE

Schüttler 3015, GFL

Einmalskalpelle, FEATHER

## Anhang

Smart SPEC 3000 Cuvette, Quartz, 1,4 ml; BIORAD

THERMO-FAST® 96 PCR Detection Plate, THERMO SCIENTIFIC

Thermomixer comfort; EPPENDORF AG

Thermoschüttler 5436, EPPENDORF

Ultraschallbad Elmasonic one; ELMA® HANS SCHMIDBAUER GMBH & CO KG

Vortex Genie 2™, BENDER UND HOBEIN AG

Waage KB 360-3N, KERN

Waage, SATORIUS

Zentrifuge 5415; Eppendorf AG

Zentrifuge, Micro Centrifuge, 6000 rpm; Carl Roth GmbH & Co. KG

### 9.4 Puffer und Lösungen für die Proteinanalyse

#### 9.4.1 Puffer für die Extraktion

##### 9.4.1.1 Radioimmunoprecipitation assay – Puffer (RIPA-Puffer), 200 ml

10 mM Tris-HCL pH 7,4	20 ml
0,15 M NaCl	1,7532 g
0,1 % SDS	0,2 g
1 % Triton X 100	2 ml
1 % Natriumdesoxycholat	2 g oder 2 ml
1 mM Na-Orthovanadat	3,678 g

***mit aq. dest auf 200 ml auffüllen***

PMSF 5,7 µl in 1 ml RIPA-Puffer pipetieren

(17,4 mg lösen in 1 ml Isopropanol)

##### 9.4.1.2 Tris-HCl-Puffer (10mM, pH 7,4)

Tris M= 157,6 g / mol

157,6 g in 1l = 1 M

15,76 g in 1l = 0,1 M

1,576 g in 100ml = 0,1 M

## Anhang

für 100 ml, 1,576 g abwiegen, in 90 ml lösen und mit HCl auf pH 7,4 einstellen anschließend mit aq. dest auf 100 ml auffüllen.

### 9.4.2 Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

#### 9.4.2.1 Sammelgelpuffer pH 6,8 0,5 M Tris-HCl

Tris – Base 6 g

60 ml aq. dest

- ▶ pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen
- ▶ bei 4 °C im Kühlschrank lagern

#### 9.4.2.2 Trenngelpuffer pH 8,8 1,5 M Tris-HCl

Tris – Base 54,45 g

150 ml aq. dest

- ▶ pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen und auf 300 ml auffüllen
- ▶ bei 4 °C im Kühlschrank lagern

#### 9.4.2.3 Denaturierungspuffer

***(62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % Glycerol; 2 % SDS; 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol)***

Destilliertes Wasser 3,0 ml

Sammelgelpuffer (0,5M) pH 6,8 1,0 ml

Glycerol (pur) 1,6 ml

10 % SDS 1,6 ml

$\beta$ -mercaptoethanol 0,4 ml

0,5 % Bromphenolblau 0,4 ml

**8 ml**

- ▶ In Aliquots (1 ml) eingefroren bei – 20 °C lagern.

### 9.4.2.4 Herstellung SDS-PAGE Lösung

Tabelle 11: Pipettierschema für zwei 9,5cm x 9,5cm Gele.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>
<b>Gelkonzentration</b>	<b>4%</b>	<b>10%</b>
<b>30% Acrylamid/Bisacrylamid (Mischungsverhältnis 37,5 : 1)</b>	0,65 ml	3,3 ml
<b>A.dest.</b>	3,05 ml	4,1 ml
<b>Sammelgelpuffer</b>	1,25 ml	
<b>Trenngelpuffer</b>		2,5 ml
<b>10 % SDS</b>	0,05 ml	0,1 ml
<b>10% APS</b>	25 µl	50 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>5 ml</b>	<b>10 ml</b>

### 9.4.3 Coomassie-Färbung

#### 9.4.3.1 Färbvorschrift Roti Blue (Roth)

##### Fixierlösung (100 ml)

Wasser	79 ml
o-Phosphorsäure 85%	1 ml
Methanol	20 ml

##### Färbelösung (100 ml)

Wasser	60 ml
Methanol	20 ml
Roti-Blue	20 ml

##### Entfärber/Waschlösung (100 ml)

Wasser	75 ml
Methanol	25 ml

**Stabilisierungslösung (100 ml)**

20 g Ammoniumsulfat in 100 ml Wasser lösen

**Glycerinlösung (100 ml)**

Glycerin 99,5 %	10 ml
Ethanol, vergällt (99,9 %)	20 ml
Wasser	70 ml

**9.4.3.2 Färbevorschrift Roti Blue (Roth), modifiziert**

**Fixierlösung (100 ml)**

Wasser	79 ml
o-Phosphorsäure 85%	1 ml
Isopropanol	20 ml

**Färbelösung (100 ml)**

Wasser	60 ml
Isopropanol	20 ml
Roti-Blue	20 ml

**Entfärber/Waschlösung (100 ml)**

Wasser	75 ml
Isopropanol	25 ml

**Stabilisierungslösung (100 ml)**

20 g Ammoniumsulfat in 100 ml Wasser lösen

**Glycerinlösung (100 ml)**

Glycerin 99,5 %	10 ml
Ethanol, vergällt (99,9 %)	20 ml
Wasser	70 ml

### 9.4.3.3 Färbevorschrift aus dem Laborjournal 2003, modifiziert

#### Färbelösung (100 ml)

Wasser	45 ml
Isopropanol	25 ml
Essigsäure (100%)	10 ml
Roti-Blue	20 ml

#### Entfärber (100 ml)

10%ige Essigsäure (pur)  
(aus 10 ml Eisessig und 90 ml Wasser)

#### Waschlösung (100 ml)

Wasser

### 9.4.3.4 Färbevorschrift der Firma Serva

#### Fixierlösung

Wasser	50 ml
Essigsäure (100%)	10 ml
Ethanol, vergällt (99,9 %)	40 ml

#### Stocklösung I

0,2 % Brilliant Blau R 250 in 90 % Ethanol (vergällt)  
(100 mg Brilliant Blau R 250 in 50 ml 90 %-igem Ethanol, vergällt)

#### Stocklösung II

Wasser	80 ml
Essigsäure (100%)	20 ml

#### Entfärber I

Entspricht der Fixierlösung

**Entfärber II**

Wasser	70 ml
Essigsäure (100%)	10 ml
Ethanol, vergällt (99,9 %)	20 ml

**9.4.4 Silberfärbung nach Blum et al., 1987 modifiziert von Lerch, 2001**

**Fixierlösung**

40 % Ethanol, vergällt	400 ml
10 % Essigsäure	100 ml
0,5 ml/l Formaldehyd (37 %)	5 ml
aq. dest	500 ml

**Waschlösung**

Wasser	500 ml
Ethanol, vergällt (99,9 %)	500 ml

**Sensibilisierungslösung**

0,02 % Natriumthiosulfat	200 mg
ad 1000 ml aq. dest	

**Silberlösung**

0,2% Silbernitrat	2 g
Formaldehyd (37 %)	0,75ml
ad 1000ml aq. dest	

**Entwicklerlösung**

5% Natriumcarbonat	60 g
0,04% Formalin (37%ige Lösung)	0,5 ml
0,0005 % Natriumthiosulfat	4 mg
ad 1000ml aq. dest	



#### 9.4.6.2 Entfärber

Isopropanol	25 ml
Essigsäure (100 %)	10 ml
A.dest	65 ml

#### 9.4.7 Immundetektion

##### 9.4.7.1 Blockierlösung (für 100 ml)

4 % Milchpulver	4g
TTBS	100 ml

##### 9.4.7.2 10x TBS (für 500 ml)

1 M Tris - Base ,pH 7,5	60,57 g
1,5 M NaCl	43,83 g

ad 500ml aq. dest

##### 9.4.7.3 1 x TTBS (für 500 ml)

1x TBS	50 ml (10xTBS)
0,1% Tween 20	500 µl (100% Tween 20)

ad 500ml aq. dest

##### 9.4.7.4 Ansatz Primärantikörper

- **1:1500**
- Endvolumen **18 ml**
- **0,012ml (12µl) AK + 17,988ml Blocking-solution**

##### 9.4.7.5 Ansatz Sekundärantikörper

- **1:7500**
- Endvolumen **22,5 ml**
- **0,003 ml (3 µl) AK + 22,497 ml TTBS**

## 9.4.8 Puffer für die Immunhistochemie

### 9.4.8.1 Zitratpuffer (pH 6,0)

Stammlösung **A**: Zitronensäure 2,101 g in 100 ml aq. dest lösen

Stammlösung **B**: Natriumcitrat 5,882g in 200 ml aq. dest lösen

Gebrauchslösung: 4,5 ml Lösung **A** + 20,5 ml Lösung **B** auf 250 ml mit aq. dest auffüllen.

Vier Wochen im Kühlschrank haltbar.

### 9.4.8.2 TBS – Puffer (pH 7,4)

Tris – Base 4 g

Tris – HCL 34,25g

NaCl 43,9 g

Mit aq. dest auf 5 l auffüllen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen

## 9.5 Temperaturprofile

### 9.5.1 Dehydrierungsprogramm des Shandon, Hypercenter XP (Thermo Scientific)

Lösung	Dauer	Wiederholung
Ethanol 70 %	1 Std.	1x
Ethanol 70 %	2 Std.	1x
Ethanol 96 %	2 Std	2 x
Ethanol absolut	1,5 Std.	1 x
Ethanol absolut	2 Std.	1 x
Ethanol absolut	2,5 Std.	1x
Xylol	1,5 Std.	1 x
Xylol	2 Std.	1 x
Xylol	2,5 Std.	1x
Paraffin	2 Std.	2 x

### 9.5.2 PCR Programm RT-qPCR nDNA

Temperaturprofil für RT-qPCR nukleärer DNA. Die Messung erfolgt bei 60 °C.

Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	50 °C	10 Sek.
1 x	95 °C	10 Min.
40 x	95 °C	30 Sek.
	60 °C	1 Min.

### 9.5.3 PCR Programm RT-qPCR mtDNA

Temperaturprofil für RT-qPCR mitochondrialer DNA. Die Messung erfolgt bei 72 °C.

Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	95 °C	10 Min.
40 x	94 °C	1 Min.
	55 °C	1 Min.
	72 °C	2 Min.

## 9.6 PCR Reaktionsansätze

### 9.6.1 Reaktionsansatz für nukleäre DNA für eine Probe (2 µl DNA Einsatz)

Reagenz	eingesetztes Volumen (µl)
Aqua bidest	13,93
Immobuffer	2,50
dNTPs	2,00
Primer Mix (1:4)	2,00
DMSO	2,00
Magnesiumchlorid	1,00
Telo Sonde (1:10)*	0,75
Immolase	0,20
DNA Probe	2,00
<b>gesamt</b>	<b>25,00</b>

\*NED - markiert

### 9.6.2 Reaktionsansatz für mtDNA und dmtDNA<sup>4977</sup> für eine Probe (2 µl DNA Einsatz)

Reagenz	eingesetztes Volumen (µl)
Aqua bidest	12,80
Immobuffer	2,50
dNTPs	2,00
Wildtyp Primer (pur)	0,50
Deletions-Primer (pur)	2,00
DMSO	1,00
Magnesiumchlorid	0,75
Wildtyp Sonde (1:10) *	0,625
Deletions-Sonde (1:20) **	0,625
Immolase	0,20
DNA Probe	2,00
<b>gesamt</b>	<b>25,00</b>

\* FAM – markiert; \*\*VIC - markiert

## 9.7 Tabellen

### 9.7.1 Daten der Pilotstudie

**Tabelle 12: Probendaten.** Aufgeführt sind das Alter der Verstorbenen, das Geschlecht und die Todesursache.

Probennummer	Geschlecht	Alter	Todesursache
G001	männlich	27	Drogenabusus
G002	männlich	57	Herzinfarkt
G003	weiblich	76	Herzbeuteltamponade
G004	männlich	69	Multiorganversagen
G005	weiblich	73	morphologisch nicht geklärt, bekannte Herz- und Niereninsuffizienz
G006	weiblich	39	morphologisch nicht geklärt, Herztod?, V.a. Intoxikation
G007	männlich	25	Hyperthermie, Verkehrsunfall
G008	männlich	81	morphologisch nicht geklärt, eventl. Nierenversagen
G009	männlich	66	Ertrinken, alkoholisiert
G010	weiblich	71	Herztod
G011	weiblich	39	Herzbeutel Tamponade
G012	weiblich	75	Hyperthermie, CO-Intoxikation
G013	männlich	73	akute eitrige Pankreatitis, Herztod
G014	weiblich	68	Bauchfellentzündung
G015	weiblich	87	globale Herzinsuffizienz
G016	männlich	68	Herztod
G017	weiblich	48	Hypoxie, Bollustod, alkoholisiert
G018	weiblich	53	Ertrinken
G019	weiblich	83	Hypothermie
G020	männlich	50	akuter Herzinfarkt
G021	weiblich	69	Hypothermie. Beginnende Leberzirrose
G022	männlich	47	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, BAK 4,1‰, Alkoholiker
G023	männlich	44	verbluten nach Herzstich, Alkoholiker
G024	männlich	55	Herztod
G025	männlich	54	Rechtsherzversagen, Rektumkarzinom
G026	weiblich	72	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholiker
G027	männlich	72	Ertrinken
G028	männlich	21	akuter Blutverlust, Beckentrauma, vom PKW überrollt, alkoholisiert
G029	männlich	43	Herzmuskelinfarkt
G030	weiblich	66	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation

## Anhang

<b>G031</b>	weiblich	47	Hypoxie, Asthma, Lebertumor
<b>G032</b>	männlich	61	morphologisch nicht geklärt
<b>G033</b>	weiblich	72	Hämorrhagischer Schock, 2 Aortenrupturen, Sprung aus gr. Höhe
<b>G034</b>	männlich	30	Hämorrhagischer Schock, Alkoholiker
<b>G035</b>	männlich	19	Verkehrsunfall, Fraktur des 3. Halswirbelkörpers
<b>G036</b>	weiblich	84	globale Herzversagen, Herzmuskelmassenvermehrung
<b>G037</b>	weiblich	60	frischer Herzinfarkt
<b>G038</b>	männlich	70	morphologisch nicht geklärt, V.a. Herztod / Intoxikation
<b>G039</b>	weiblich	44	Verbluten
<b>G040</b>	weiblich	53	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholiker
<b>G041</b>	männlich	63	zentrales Regulationsversagen, DD Vergiftung Opiate /Benzodiazepine
<b>G042</b>	männlich	66	Herzinfarkt
<b>G043</b>	männlich	55	atypisches Erhängen
<b>G044</b>	männlich	79	subakute Koronarinsuffizienz, finale Unterkühlung
<b>G045</b>	männlich	40	Pneumonie
<b>G046</b>	männlich	54	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation
<b>G047</b>	männlich	49	Ersticken, Bollustod
<b>G048</b>	männlich	37	Herzinfarkt
<b>G049</b>	männlich	89	Gastrointestinalblutung
<b>G050</b>	männlich	65	Ertrinken
<b>G051</b>	männlich	63	akuter Herztod
<b>G052</b>	männlich	56	Asphyxie, Erdrosseln
<b>G053</b>	weiblich	74	Kardiorespiratorisches Versagen, Bronchitis
<b>G054</b>	männlich	60	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation
<b>G055</b>	weiblich	77	Kardiorespiratorisches Versagen
<b>G056</b>	männlich	60	Pneumonie
<b>G057</b>	weiblich	61	akuter Herztod
<b>G058</b>	weiblich	82	Hyperthermie, CO-Intoxikation
<b>G059</b>	weiblich	58	Verbluten
<b>G060</b>	männlich	78	Bauchschuss
<b>G061</b>	weiblich	41	Rechtsherzversagen
<b>G062</b>	männlich	60	Herzinfarkt
<b>G063</b>	männlich	54	zentrales Regulationsversagen, Alkoholiker
<b>G064</b>	männlich	62	Ertrinken
<b>G065</b>	männlich	44	Hypoxie
<b>G066</b>	männlich	24	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation
<b>G067</b>	männlich	47	morphologisch nicht geklärt, Alkoholiker, epileptische Anfälle
<b>G068</b>	männlich	78	Verbluten
<b>G069</b>	weiblich	74	Herztod

## Anhang

<b>G070</b>	weiblich	78	Verbluten
<b>G071</b>	männlich	46	Alkoholabusus
<b>G072</b>	männlich	74	Herztod
<b>G073</b>	männlich	35	Herzinfarkt
<b>G074</b>	weiblich	88	zentrales Regulationsversagen, Sepsis
<b>G075</b>	weiblich	47	Hirnbasisarterienaneurysma
<b>G076</b>	männlich	59	Herzinfarkt
<b>G077</b>	männlich	32	Hypoxie
<b>G078</b>	weiblich	51	Rechtsherzversagen
<b>G079</b>	männlich	57	zentrales Regulationsversagen, Insulinintoxikation
<b>G080</b>	männlich	52	Herzmuskelfarkt, Diabetes mellitus
<b>G081</b>	weiblich	81	intracerebrale Blutungen
<b>G082</b>	männlich	25	Intoxikation
<b>G083</b>	männlich	71	Herzmuskel Reinfarkt
<b>G084</b>	weiblich	72	Ersticken, Bollustod
<b>G085</b>	männlich	65	Verbluten nach Messerstich
<b>G086</b>	männlich	36	Hyperthermie
<b>G087</b>	männlich	72	morphologisch nicht geklärt, cerebrale Atherosklerose
<b>G088</b>	männlich	23	morphologisch nicht geklärt, V.a. Intoxikation, Alkoholiker
<b>G089</b>	männlich	68	Hyperthermie
<b>G090</b>	weiblich	58	Linksherzversagen
<b>G091</b>	männlich	46	Herzinfarkt
<b>G092</b>	männlich	81	Lungenentzündung
<b>G093</b>	männlich	74	Leberausfallkoma, Leberzirrose
<b>G094</b>	weiblich	65	Verbluten
<b>G095</b>	männlich	45	Herztod
<b>G096</b>	männlich	49	Hyperthermie
<b>G097</b>	weiblich	58	Herzrhythmusstörungen, Erfrieren
<b>G098</b>	männlich	5	morphologisch nicht geklärt, Bronchitis
<b>G099</b>	männlich	30	Stichverletzung
<b>G100</b>	weiblich	53	akuter Herztod

## Anhang

**Tabelle 13: Die berechneten Werte des Mann-Whitney-U Tests.** Mithilfe des Mann-Whitney-U Tests lässt sich eine Hypothesenentscheidung treffen. Hierzu wird der p-Wert errechnet, das heißt, ob die Nullhypothese angenommen oder abgelehnt werden kann. Es werden zwei Hypothesen aufgestellt: eine Nullhypothese (Fragestellung) und eine Alternativhypothese (Verneinung der Fragestellung). Die Berechnung erfolgte mit Hilfe von [elegans.som.vcu.edu](http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html) [http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html, Stand: 22.03.2012].

Wertepaarung	P-Value	< angenommenes Signifikanzlevel
nDNA Rinde GH vs. nDNA Mark GH	0,244	0,05
nDNA Rinde KH vs. nDNA Mark KH	0,856	0,05
nDNA Rinde GH vs. nDNA Rinde KH	0,362	0,05
nDNA Mark GH vs. nDNA Mark KH	0,468	0,05
nDNA Rinde GH m vs. nDNA Rinde GH w	0,5819	0,05
nDNA Rinde KH m vs. nDNA Rinde KH w	0,2062	0,05
nDNA Mark GH m vs. nDNA Mark GH w	0,3261	0,05
nDNA Mark KH m vs. nDNA Mark KH w	0,2565	0,05
nDNA Rinde GH vs. Lebensalter	3,75E-09	0,05
nDNA Rinde KH vs. Lebensalter	7,93E-05	0,05
nDNA Mark GH vs. Lebensalter	1,38E-14	0,05
nDNA Mark KH vs. Lebensalter	1,38E-15	0,05
mtDNA Rinde GH vs. mtDNA Mark GH	1,12E-05	0,05
mtDNA Rinde KH vs. mtDNA Mark KH	0,05	0,05
mtDNA Rinde GH vs. mtDNA Rinde KH	2,38E-08	0,05
mtDNA Mark GH vs. mtDNA Mark KH	0,56	0,05
mtDNA Rinde GH m vs. mtDNA Rinde GH w	1,00	0,05
mtDNA Rinde KH m vs. mtDNA Rinde KH w	0,88	0,05
mtDNA Mark GH m vs. mtDNA Mark GH w	0,98	0,05
mtDNA Mark KH m vs. mtDNA Mark KH w	0,98	0,05
dmtDNA4977 Rinde GH m vs. dmtDNA4977 Rinde GH w	0,14	0,05
dmtDNA4977 Rinde KH m vs. dmtDNA4977 Rinde KH w	0,17	0,05
dmtDNA4977 Mark GH m vs. dmtDNA4977 Mark GH w	0,44	0,05
dmtDNA4977 Mark KH m vs. dmtDNA4977 Mark KH w	0,85	0,05
dmtDNA4977 Rinde GH vs. Lebensalter	5,03E-32	0,05
dmtDNA4977 Rinde KH vs. Lebensalter	3,21E-30	0,05
dmtDNA4977 Mark GH vs. Lebensalter	2,43E-33	0,05
dmtDNA4977 Mark KH vs. Lebensalter	5,37E-34	0,05
dmtDNA4977 Rinde GH w vs. Lebensalter	6,21E-12	0,05
dmtDNA4977 Rinde KH w vs. Lebensalter	1,33E-09	0,05
dmtDNA4977 Rinde GH m vs. Lebensalter	3,47E-21	0,05
dmtDNA4977 Rinde KH m vs. Lebensalter	7,21E-20	0,05
dmtDNA4977 Mark GH w vs. Lebensalter	2,92E-13	0,05
dmtDNA4977 Mark KH w vs. Lebensalter	6,27E-13	0,05
dmtDNA4977 Mark GH m vs. Lebensalter	1,63E-21	0,05
dmtDNA4977 Mark KH m vs. Lebensalter	1,67E-22	0,05
HSPA8 GH m vs. HSPA8 GH w	0,1449	0,05

## Anhang

HSPA8 KH m vs. HSPA8 KH w	0,269	0,05
HSPA8 GH vs. Lebensalter	7,25E-33	0,05
HSPA8 KH vs. Lebensalter	1,45E-31	0,05
HSPA1A GH m vs. HSPA1A GH w	3,35E-02	0,05
HSPA1A KH m vs. HSPA1A KH w	0,1077	0,05
HSPA1A GH vs. Lebensalter	8,87E-34	0,05
HSPA1A KH vs. Lebensalter	9,70E-34	0,05

## Anhang

**Tabelle 14: Endwerte (nDNA, mtDNA und dmtDNA<sup>4977</sup>) für die Auswertung im Großhirngewebe (Rinde).**

Probennr.	Gewebe	nDNA (ng/μl)	Anzahl der Zellen	Mtdna-Kopien Pro Zelle	dmtDNA <sup>4977</sup> in %
G001	Großhirn	138	229917	3603	0,0000
G002	Großhirn	165	274222	62	1,0943
G003	Großhirn	80	133833	5455	0,0007
G004	Großhirn	42	69667	8421	0,0015
G005	Großhirn	42	69667	6914	0,0353
G006	Großhirn	20	32958	8722	0,0000
G007	Großhirn	82	136375	3935	0,0019
G008	Großhirn	59	98208	1541	0,0000
G009	Großhirn	34	55958	337	0,1252
G010	Großhirn	20	33500	16816	0,3554
G011	Großhirn	260	433625	176	0,0250
G012	Großhirn	51	84167	6851	0,0625
G016	Großhirn	72	120042	548	0,0117
G018	Großhirn	53	87611	768	0,2319
G021	Großhirn	0	636	3350	0,6952
G022	Großhirn	29	47861	6573	0,3141
G023	Großhirn	21	34444	8134	0,1377
G024	Großhirn	4	6100	1064	0,4931
G026	Großhirn	0	256	2314	1,0779
G028	Großhirn	113	187625	6023	0,0015
G029	Großhirn	39	64875	10713	0,0211
G030	Großhirn	22	35833	6013	0,0088
G031	Großhirn	72	119625	4737	0,3258
G032	Großhirn	25	40958	13388	0,0693
G033	Großhirn	47	78167	4893	0,9028
G034	Großhirn	40	67333	19208	0,0000
G035	Großhirn	182	304000	5055	0,0001
G036	Großhirn	67	111208	10761	0,1541
G037	Großhirn	618	1029750	2090	0,0444
G038	Großhirn	187	310875	3222	0,0050
G039	Großhirn	110	183250	2610	0,1607
G040	Großhirn	83	137750	9135	0,0589
G041	Großhirn	72	119667	14958	0,1397
G042	Großhirn	176	293208	4451	0,0883
G043	Großhirn	6	9542	35507	0,0582
G044	Großhirn	43	71028	9386	0,0922
G045	Großhirn	35	57708	10397	0,0494
G046	Großhirn	56	94042	1110	0,7605
G047	Großhirn	57	94667	10053	0,0005
G048	Großhirn	151	252375	4827	0,0237
G049	Großhirn	107	178458	10413	0,0694

## Anhang

G050	Großhirm	57	94750	12806	0,0938
G051	Großhirm	75	124333	8043	0,0362
G052	Großhirm	373	621639	1702	0,0103
G053	Großhirm	90	150583	4250	0,0275
G054	Großhirm	158	263792	5358	0,0010
G055	Großhirm	167	277917	3472	0,2045
G056	Großhirm	353	588417	1595	0,0085
G057	Großhirm	83	138125	71	0,1952
G058	Großhirm	109	180917	8526	0,0961
G059	Großhirm	505	842208	3869	0,2132
G060	Großhirm	397	661194	2924	0,6774
G061	Großhirm	210	349611	8116	0,4596
G062	Großhirm	274	457278	6697	0,2972
G063	Großhirm	406	676708	6970	0,5491
G064	Großhirm	310	516250	4605	0,2853
G065	Großhirm	260	433639	4271	0,0560
G066	Großhirm	312	520500	446	0,8395
G067	Großhirm	310	516056	6379	0,2012
G068	Großhirm	485	808583	5091	0,4890
G069	Großhirm	363	604292	2631	0,3790
G070	Großhirm	370	617333	15166	0,2071
G071	Großhirm	347	578000	25447	0,0535
G072	Großhirm	273	454875	17551	0,1229
G073	Großhirm	264	440000	15455	0,0173
G074	Großhirm	630	1050639	12314	0,2381
G075	Großhirm	353	588444	27573	0,0380
G076	Großhirm	353	588278	2270	0,4824
G077	Großhirm	470	783208	13736	0,0133
G078	Großhirm	521	867958	18031	0,0993
G079	Großhirm	491	818750	11359	0,0965
G080	Großhirm	364	606708	13049	0,0681
G081	Großhirm	485	809000	15245	0,0127
G082	Großhirm	476	793528	21077	0,0135
G083	Großhirm	372	619167	18600	0,0705
G084	Großhirm	525	875458	11423	0,3535
G085	Großhirm	459	764458	8405	0,2096
G086	Großhirm	501	835306	8011	0,1906
G087	Großhirm	415	691333	5931	0,2785
G088	Großhirm	451	751722	8863	0,0999
G089	Großhirm	937	1561208	317	2,8053
G090	Großhirm	351	585000	7764	0,1284
G091	Großhirm	381	635389	763	0,7651
G092	Großhirm	587	978417	6013	0,2953
G093	Großhirm	372	619333	5934	0,0903
G094	Großhirm	461	767917	1879	1,0736
G095	Großhirm	1057	1761708	5350	0,1830

## Anhang

<b>G096</b>	Großhirn	1304	2172583	3157	0,5004
<b>G097</b>	Großhirn	1130	1883833	2628	0,0706
<b>G098</b>	Großhirn	444	740361	5560	0,0013
<b>G099</b>	Großhirn	787	1312000	9985	0,2416
<b>G100</b>	Großhirn	921	1535167	10447	0,2364

**Tabelle 15: Endwerte (nDNA, mtDNA und dmtDNA<sup>4977</sup>) für die Auswertung im Kleinhirngewebe (Rinde).**

Probennr.	Gewebe	nDNA (ng/μl)	Anzahl der Zellen	Mtdna-Kopien Pro Zelle	dmtDNA <sup>4977</sup> in %
<b>G003</b>	Kleinhirn	21	34583	7615	0,0000
<b>G004</b>	Kleinhirn	488	812542	2039	0,0000
<b>G005</b>	Kleinhirn	196	326167	863	0,0058
<b>G006</b>	Kleinhirn	90	149750	3996	0,0000
<b>G007</b>	Kleinhirn	667	1112375	393	0,0000
<b>G008</b>	Kleinhirn	1286	2142542	650	0,0000
<b>G015</b>	Kleinhirn	12	19708	8186	0,2434
<b>G016</b>	Kleinhirn	9	14417	35838	0,3485
<b>G020</b>	Kleinhirn	13	21417	2504	0,0125
<b>G021</b>	Kleinhirn	35	59125	192	0,1008
<b>G022</b>	Kleinhirn	9	14375	1285	0,0416
<b>G023</b>	Kleinhirn	19	30833	928	0,0267
<b>G024</b>	Kleinhirn	71	118458	159	0,0709
<b>G026</b>	Kleinhirn	67	111000	910	0,0046
<b>G029</b>	Kleinhirn	43	71111	4224	0,0000
<b>G032</b>	Kleinhirn	73	121222	5156	0,0000
<b>G034</b>	Kleinhirn	566	943306	645	0,0000
<b>G035</b>	Kleinhirn	75	125000	3267	0,0000
<b>G036</b>	Kleinhirn	54	89625	860	0,0018
<b>G037</b>	Kleinhirn	281	468458	808	0,0002
<b>G038</b>	Kleinhirn	87	145667	2602	0,0004
<b>G039</b>	Kleinhirn	163	272042	1145	0,0039
<b>G040</b>	Kleinhirn	37	61667	9568	0,0021
<b>G041</b>	Kleinhirn	79	132333	2999	0,0033
<b>G042</b>	Kleinhirn	8	13875	25367	0,0034
<b>G043</b>	Kleinhirn	56	93833	3798	0,0004
<b>G044</b>	Kleinhirn	27	45750	5712	0,0012
<b>G045</b>	Kleinhirn	152	253792	1713	0,0025
<b>G046</b>	Kleinhirn	76	126333	162	0,0226
<b>G047</b>	Kleinhirn	98	162528	1418	0,0011
<b>G048</b>	Kleinhirn	375	624500	368	0,0006
<b>G049</b>	Kleinhirn	515	858083	524	0,0011
<b>G050</b>	Kleinhirn	840	1400125	248	0,0015
<b>G051</b>	Kleinhirn	68	113792	3164	0,0007

## Anhang

G052	Kleinhirn	69	114417	1634	0,0000
G053	Kleinhirn	10	16000	6983	0,0064
G054	Kleinhirn	19	31417	6342	0,0030
G055	Kleinhirn	7	11528	13148	0,0035
G056	Kleinhirn	25	42000	2840	0,0000
G058	Kleinhirn	12	20611	15320	0,0000
G059	Kleinhirn	350	583333	916	0,0056
G060	Kleinhirn	106	175833	4526	0,0104
G061	Kleinhirn	2963	4937833	1121	0,0367
G062	Kleinhirn	298	496056	1484	0,0126
G063	Kleinhirn	2014	3356528	1687	0,0880
G064	Kleinhirn	1449	2415139	757	0,0098
G065	Kleinhirn	248	413028	1773	0,0050
G066	Kleinhirn	272	454042	124	0,0286
G067	Kleinhirn	344	573000	1765	0,0096
G068	Kleinhirn	2521	4201806	1186	0,0395
G069	Kleinhirn	212	353222	1293	0,0225
G070	Kleinhirn	863	1438792	5247	0,0035
G071	Kleinhirn	462	769222	1735	0,0001
G072	Kleinhirn	455	758458	3434	0,0017
G073	Kleinhirn	538	896417	2104	0,0001
G074	Kleinhirn	264	440708	7809	0,0050
G075	Kleinhirn	540	900750	1989	0,0003
G076	Kleinhirn	8	12833	43976	0,0093
G077	Kleinhirn	135	225333	4049	0,0000
G078	Kleinhirn	773	1288500	5297	0,0003
G079	Kleinhirn	265	441778	1061	0,0023
G080	Kleinhirn	476	793917	4771	0,0018
G081	Kleinhirn	1895	3158139	708	0,0000
G082	Kleinhirn	768	1280750	3058	0,0002
G083	Kleinhirn	231	385375	4939	0,0101
G084	Kleinhirn	224	373417	3202	0,0299
G085	Kleinhirn	344	573417	2302	0,0097
G086	Kleinhirn	179	298375	3094	0,0069
G087	Kleinhirn	499	830917	900	0,0020
G088	Kleinhirn	923	1538889	1592	0,0714
G089	Kleinhirn	438	730708	287	0,0819
G090	Kleinhirn	3724	6205958	374	0,0057
G092	Kleinhirn	1956	3259250	1330	0,0129
G093	Kleinhirn	106	176708	22023	0,0009
G094	Kleinhirn	1097	1827750	228	0,1388
G095	Kleinhirn	173	288667	3077	0,0038
G096	Kleinhirn	53	87611	4673	0,0361
G097	Kleinhirn	310	517417	1098	0,0125
G098	Kleinhirn	815	1358750	3030	0,0018
G099	Kleinhirn	345	574792	3248	0,0015

## Anhang

<b>G100</b>	Kleinhirn	1691	2818792	1020	0,0018
-------------	-----------	------	---------	------	--------

**Tabelle 16 : Endwerte (nDNA, mtDNA und dmtDNA<sup>4977</sup>) für die Auswertung im Großhirngewebe (Mark).**

Probennr.	Gewebe	nDNA (ng/μl)	Anzahl der Zellen	Mtdna-Kopien Pro Zelle	dmtDNA <sup>4977</sup> in %
G001	Großhirn	232	387104	11728	0,0123
G002	Großhirn	190	316467	4498	0,1584
G003	Großhirn	99	165138	27068	0,0355
G004	Großhirn	93	154742	22661	0,0000
G005	Großhirn	713	1188458	5708	0,1254
G006	Großhirn	239	398917	10173	0,0043
G007	Großhirn	207	344583	7574	0,0022
G008	Großhirn	253	422083	9315	0,0118
G009	Großhirn	301	501667	5734	0,0493
G010	Großhirn	513	854833	1078	0,1190
G011	Großhirn	119	198875	23164	0,1506
G012	Großhirn	40	66417	9536	0,0052
G013	Großhirn	345	574833	5593	0,0437
G014	Großhirn	1024	1706292	3516	0,0560
G015	Großhirn	70	116708	41185	0,0343
G016	Großhirn	105	175194	13024	0,0155
G017	Großhirn	52	86542	6317	0,1371
G018	Großhirn	70	116833	18516	0,0393
G019	Großhirn	57	94167	11611	0,0000
G020	Großhirn	68	113208	38219	0,0000
G021	Großhirn	107	178583	788	0,0000
G022	Großhirn	131	218861	1435	0,0000
G023	Großhirn	14	23778	12286	0,0000
G024	Großhirn	39	64583	3560	0,0000
G026	Großhirn	70	116583	3556	0,0000
G027	Großhirn	50	83250	4744	0,0000
G028	Großhirn	120	200000	1048	0,0000
G029	Großhirn	257	427958	395	0,0000
G030	Großhirn	78	130556	1957	0,0000
G031	Großhirn	303	504792	1260	0,0000
G033	Großhirn	82	136375	5139	0,0000
G034	Großhirn	229	382208	1037	0,0000
G036	Großhirn	476	794125	257	0,0000
G037	Großhirn	28	46792	11096	0,0184
G038	Großhirn	135	224750	1884	0,0211
G039	Großhirn	71	118208	2835	0,0392
G040	Großhirn	218	363667	717	0,0182
G041	Großhirn	371	618958	1689	0,0605

## Anhang

G042	Großhirn	47	79028	2904	0,0590
G043	Großhirn	97	160875	1671	0,0554
G044	Großhirn	250	417208	678	0,0093
G045	Großhirn	41	67958	1586	0,0620
G046	Großhirn	10	16625	1326	0,5232
G047	Großhirn	167	278625	3559	0,1015
G048	Großhirn	30	50125	1276	0,0156
G049	Großhirn	16	26944	3331	0,1732
G050	Großhirn	39	65500	2318	0,1281
G051	Großhirn	28	47208	1632	0,0268
G052	Großhirn	25	41708	2039	0,0178
G053	Großhirn	95	157583	2258	0,2540
G054	Großhirn	84	139208	1075	0,0099
G055	Großhirn	225	375694	845	0,4223
G056	Großhirn	604	1006194	1625	0,1288
G057	Großhirn	151	250833	112	1,4238
G058	Großhirn	117	194333	1395	0,0607
G059	Großhirn	106	175833	2966	0,1081
G060	Großhirn	302	503667	388	0,4975
G061	Großhirn	64	106083	3165	0,1456
G062	Großhirn	52	86417	4163	0,0447
G063	Großhirn	214	357361	890	0,0772
G064	Großhirn	118	196833	1746	0,0403
G065	Großhirn	308	514139	1497	0,0104
G066	Großhirn	46	77125	478	0,6782
G067	Großhirn	125	208250	693	0,0219
G068	Großhirn	930	1550000	536	0,0511
G069	Großhirn	256	427222	1384	0,0772
G070	Großhirn	215	359083	1076	0,2415
G071	Großhirn	236	392667	640	0,0098
G072	Großhirn	557	929000	1326	0,4440
G073	Großhirn	412	687083	1127	0,0901
G074	Großhirn	282	470639	1006	0,1585
G075	Großhirn	228	380028	987	0,0154
G076	Großhirn	214	357208	2035	0,5976
G077	Großhirn	144	240458	2143	0,0783
G078	Großhirn	534	889444	1013	0,0489
G079	Großhirn	251	417667	1612	0,0837
G080	Großhirn	141	234375	5184	0,0697
G081	Großhirn	52	86750	7648	0,0024
G082	Großhirn	270	450472	1896	0,0095
G083	Großhirn	88	146708	4242	0,0118
G084	Großhirn	267	445139	2956	0,4129
G085	Großhirn	46	76583	9461	0,0103
G086	Großhirn	37	61625	4532	0,0240
G087	Großhirn	98	163833	18235	0,0014

## Anhang

G088	Großhirn	26	42875	29986	0,0000
G089	Großhirn	117	195333	1437	0,0084
G090	Großhirn	920	1533875	1040	0,0259
G091	Großhirn	254	423333	137	0,6038
G092	Großhirn	537	895375	1384	0,0437
G093	Großhirn	377	628833	1110	0,0131
G094	Großhirn	524	873500	117	0,1445
G095	Großhirn	150	249667	4878	0,0386
G096	Großhirn	167	277708	2115	0,1571
G097	Großhirn	161	267792	5091	0,0108
G098	Großhirn	155	257708	5526	0,0006
G099	Großhirn	185	308417	4286	0,0802
G100	Großhirn	165	274167	5221	0,0530

**Tabelle 17: Endwerte (nDNA, mtDNA und dmtDNA<sup>4977</sup>) für die Auswertung im Kleinhirngewebe (Mark).**

Probennr.	Gewebe	nDNA (ng/μl)	Anzahl der Zellen	Mtdna-Kopien Pro Zelle	dmtDNA <sup>4977</sup> in %
G001	Kleinhirn	160	267003	3005	0,0021
G002	Kleinhirn	187	311381	390	0,1374
G003	Kleinhirn	128	213694	4623	0,0385
G004	Kleinhirn	220	367071	2105	0,0128
G005	Kleinhirn	513	855306	1434	0,2186
G006	Kleinhirn	191	317806	3258	0,0136
G007	Kleinhirn	79	131111	5307	0,0020
G008	Kleinhirn	295	491667	2174	0,0484
G009	Kleinhirn	180	300694	487	0,2357
G010	Kleinhirn	342	570222	3513	0,0783
G011	Kleinhirn	226	376056	397	0,0162
G012	Kleinhirn	106	177083	2045	0,0401
G013	Kleinhirn	95	157583	6165	0,2376
G014	Kleinhirn	297	494306	1916	0,0604
G015	Kleinhirn	96	160500	4063	0,1661
G016	Kleinhirn	199	331625	2200	0,0518
G017	Kleinhirn	44	72875	1066	0,1117
G018	Kleinhirn	210	349625	2823	0,0365
G019	Kleinhirn	52	86208	6790	0,0149
G020	Kleinhirn	293	488139	2253	0,0065
G021	Kleinhirn	58	96208	7832	0,0830
G022	Kleinhirn	280	466250	2617	0,0278
G023	Kleinhirn	85	142194	8345	0,0243
G024	Kleinhirn	75	125167	5903	0,0084
G025	Kleinhirn	33	54917	8254	0,0109
G026	Kleinhirn	119	198056	5756	0,0368

## Anhang

<b>G027</b>	Kleinhirn	143	238833	5359	0,0285
<b>G028</b>	Kleinhirn	48	80639	2445	0,0000
<b>G029</b>	Kleinhirn	148	246042	1959	0,0000
<b>G030</b>	Kleinhirn	272	454083	2118	0,0000
<b>G031</b>	Kleinhirn	280	466667	2700	0,0000
<b>G032</b>	Kleinhirn	278	464139	1340	0,0000
<b>G034</b>	Kleinhirn	111	185611	5765	0,0000
<b>G035</b>	Kleinhirn	147	244917	8615	0,0001
<b>G036</b>	Kleinhirn	169	281722	5697	0,1509
<b>G037</b>	Kleinhirn	61	102417	4983	0,0456
<b>G038</b>	Kleinhirn	90	150361	1934	0,0224
<b>G039</b>	Kleinhirn	121	201250	2963	0,0511
<b>G040</b>	Kleinhirn	248	413139	2536	0,0218
<b>G041</b>	Kleinhirn	116	192500	3058	0,0862
<b>G042</b>	Kleinhirn	108	180694	1829	0,0132
<b>G043</b>	Kleinhirn	51	84708	3877	0,0525
<b>G044</b>	Kleinhirn	68	113861	3160	0,0546
<b>G045</b>	Kleinhirn	81	134472	3125	0,0415
<b>G046</b>	Kleinhirn	136	226500	329	0,0931
<b>G047</b>	Kleinhirn	50	83028	2296	0,0089
<b>G048</b>	Kleinhirn	83	138833	1990	0,0318
<b>G049</b>	Kleinhirn	66	109208	2538	0,0695
<b>G050</b>	Kleinhirn	154	256306	1647	0,1465
<b>G051</b>	Kleinhirn	42	69750	3377	0,0667
<b>G052</b>	Kleinhirn	152	253167	758	0,0243
<b>G053</b>	Kleinhirn	26	43361	3444	0,0792
<b>G054</b>	Kleinhirn	84	140750	2084	0,0242
<b>G055</b>	Kleinhirn	36	60042	4234	0,2347
<b>G056</b>	Kleinhirn	287	479042	842	0,0196
<b>G057</b>	Kleinhirn	157	261625	366	1,5393
<b>G058</b>	Kleinhirn	345	574750	2785	0,1176
<b>G059</b>	Kleinhirn	188	314000	2613	0,0325
<b>G060</b>	Kleinhirn	246	409458	1580	0,0781
<b>G061</b>	Kleinhirn	343	571583	1424	0,0179
<b>G062</b>	Kleinhirn	103	171806	2663	0,0105
<b>G063</b>	Kleinhirn	566	942500	1650	0,0219
<b>G064</b>	Kleinhirn	446	743292	1693	0,0721
<b>G065</b>	Kleinhirn	28	47139	3805	0,0067
<b>G066</b>	Kleinhirn	142	236167	424	0,0921
<b>G067</b>	Kleinhirn	68	113472	5734	0,0247
<b>G068</b>	Kleinhirn	391	650958	820	0,2826
<b>G069</b>	Kleinhirn	66	110500	2576	0,0115
<b>G070</b>	Kleinhirn	716	1193750	796	0,3767
<b>G071</b>	Kleinhirn	33	54708	8788	0,0469
<b>G072</b>	Kleinhirn	64	107250	2463	0,0486
<b>G073</b>	Kleinhirn	117	195417	1396	0,0070

## Anhang

<b>G074</b>	Kleinhirn	171	284375	1735	0,0847
<b>G075</b>	Kleinhirn	116	193625	2689	0,0254
<b>G076</b>	Kleinhirn	89	148639	2239	0,2587
<b>G077</b>	Kleinhirn	56	93417	2122	0,0144
<b>G078</b>	Kleinhirn	132	220278	670	0,0126
<b>G079</b>	Kleinhirn	346	575861	893	0,0151
<b>G080</b>	Kleinhirn	61	101625	9249	0,0092
<b>G081</b>	Kleinhirn	16	26958	29702	0,0134
<b>G082</b>	Kleinhirn	208	346333	2902	0,0027
<b>G083</b>	Kleinhirn	206	342528	3211	0,0794
<b>G084</b>	Kleinhirn	74	122694	15541	0,1528
<b>G085</b>	Kleinhirn	32	52556	17204	0,0099
<b>G086</b>	Kleinhirn	193	322111	2391	0,0126
<b>G087</b>	Kleinhirn	160	267278	10055	0,0007
<b>G088</b>	Kleinhirn	69	114792	23848	0,0002
<b>G089</b>	Kleinhirn	80	133167	1237	0,0041
<b>G090</b>	Kleinhirn	1297	2161667	1330	0,0044
<b>G091</b>	Kleinhirn	475	792000	293	0,1957
<b>G092</b>	Kleinhirn	277	462250	2667	0,0638
<b>G093</b>	Kleinhirn	388	646972	1517	0,0116
<b>G094</b>	Kleinhirn	195	324972	398	0,4915
<b>G095</b>	Kleinhirn	143	237583	5126	0,0105
<b>G096</b>	Kleinhirn	39	65792	9494	0,0087
<b>G097</b>	Kleinhirn	287	478583	3785	0,0054
<b>G098</b>	Kleinhirn	96	160667	6942	0,0000
<b>G099</b>	Kleinhirn	145	242292	2885	0,0009
<b>G100</b>	Kleinhirn	68	112542	4575	0,0000

## Anhang

**Tabelle 18:: Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) in der Großhirn- und Kleinhirnrinde. Mit Angabe der Umrechnung in  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .**

Probennr.	Gewebe	Konzentration $\mu\text{g} / \text{ml}$	Konzentration $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	Probennr.	Gewebe	Konzentration $\mu\text{g} / \text{ml}$	Konzentration $\mu\text{g} / \mu\text{l}$
G001	Großhirn	91470,8672	91,4708672	G001	Kleinhirn	178234,2813	178,2342813
G002	Großhirn	169734,7344	169,7347344	G002	Kleinhirn	116609,5703	116,6095703
G003	Großhirn	289565,5	289,5655	G003	Kleinhirn	200665,125	200,665125
G004	Großhirn	156043,75	156,04375	G004	Kleinhirn	165893,2813	165,8932813
G005	Großhirn	151192,2813	151,1922813	G005	Kleinhirn	180555,25	180,55525
G006	Großhirn	286245,1563	286,2451563	G006	Kleinhirn	146247,2969	146,2472969
G007	Großhirn	189684,8594	189,6848594	G007	Kleinhirn	213561,4375	213,5614375
G008	Großhirn	195221,6875	195,2216875	G008	Kleinhirn	204777,9688	204,7779688
G009	Großhirn	199919,4375	199,9194375	G009	Kleinhirn	214346,2031	214,3462031
G010	Großhirn	260364,2969	260,3642969	G010	Kleinhirn	209143,3438	209,1433438
G011	Großhirn	237379,625	237,379625	G011	Kleinhirn	212914,8125	212,9148125
G012	Großhirn	172786,8281	172,7868281	G012	Kleinhirn	209674,3281	209,6743281
G013	Großhirn	165859,125	165,859125	G013	Kleinhirn	151331,3438	151,3313438
G014	Großhirn	101040,0078	101,0400078	G014	Kleinhirn	188955,9063	188,9559063
G015	Großhirn	234127,2188	234,1272188	G015	Kleinhirn	204074,9219	204,0749219
G016	Großhirn	230078,2969	230,0782969	G016	Kleinhirn	164064,7969	164,0647969
G017	Großhirn	69579,9297	69,5799297	G017	Kleinhirn	67315,2969	67,3152969
G018	Großhirn	114448,3594	114,4483594	G018	Kleinhirn	90215,2031	90,2152031
G019	Großhirn	67409,3047	67,4093047	G019	Kleinhirn	112591,1719	112,5911719
G020	Großhirn	132639,5938	132,6395938	G020	Kleinhirn	170738,6563	170,7386563
G021	Großhirn	147940,7813	147,9407813	G021	Kleinhirn	76359,375	76,359375
G022	Großhirn	82528,7891	82,5287891	G022	Kleinhirn	141542,4688	141,5424688
G023	Großhirn	146474,875	146,474875	G023	Kleinhirn	149920,1875	149,9201875
G024	Großhirn	153802,375	153,802375	G024	Kleinhirn	189759,3594	189,7593594
G025	Großhirn	89395,2734	89,3952734	G025	Kleinhirn	116582,4141	116,5824141
G026	Großhirn	179720,9375	179,7209375	G026	Kleinhirn	73242,4297	73,2424297
G027	Großhirn	148827,5156	148,8275156	G027	Kleinhirn	133765,2344	133,7652344
G028	Großhirn	110580,4922	110,5804922	G028	Kleinhirn	79153	79,153
G029	Großhirn	151250,9219	151,2509219	G029	Kleinhirn	107201,7422	107,2017422
G030	Großhirn	130745,9453	130,7459453	G030	Kleinhirn	103085,6094	103,0856094
G031	Großhirn	212904,5156	212,9045156	G031	Kleinhirn	110871,9297	110,8719297
G032	Großhirn	110964,7656	110,9647656	G032	Kleinhirn	85342,4766	85,3424766
G033	Großhirn	93201,7344	93,2017344	G033	Kleinhirn	89767,6953	89,7676953
G034	Großhirn	133819,5938	133,8195938	G034	Kleinhirn	141521,3438	141,5213438
G035	Großhirn	165127,1563	165,1271563	G035	Kleinhirn	125065,8359	125,0658359
G036	Großhirn	183255,4531	183,2554531	G036	Kleinhirn	168471,4688	168,4714688
G037	Großhirn	156992	156,992	G037	Kleinhirn	114978,7266	114,9787266
G038	Großhirn	112103,7813	112,1037813	G038	Kleinhirn	110662,4375	110,6624375
G039	Großhirn	153022,625	153,022625	G039	Kleinhirn	130145,3125	130,1453125
G040	Großhirn	147892,2656	147,8922656	G040	Kleinhirn	148024,8594	148,0248594

## Anhang

<b>G041</b>	Großhirn	100751,7891	100,7517891	G041	Kleinhirn	108056,7266	108,0567266
<b>G042</b>	Großhirn	77867,6406	77,8676406	G042	Kleinhirn	180798,5469	180,7985469
<b>G043</b>	Großhirn	197319,0781	197,3190781	G043	Kleinhirn	182469,3438	182,4693438
<b>G044</b>	Großhirn	62698,1484	62,6981484	G044	Kleinhirn	84529,4609	84,5294609
<b>G045</b>	Großhirn	123807,9766	123,8079766	G045	Kleinhirn	118775,8828	118,7758828
<b>G046</b>	Großhirn	98799,5313	98,7995313	G046	Kleinhirn	111359,9766	111,3599766
<b>G047</b>	Großhirn	111666,0625	111,6660625	G047	Kleinhirn	161971,9844	161,9719844
<b>G048</b>	Großhirn	141459,9688	141,4599688	G048	Kleinhirn	191579,4531	191,5794531
<b>G049</b>	Großhirn	133414,625	133,414625	G049	Kleinhirn	177416,3438	177,4163438
<b>G050</b>	Großhirn	114874,3906	114,8743906	G050	Kleinhirn	160935,3906	160,9353906
<b>G051</b>	Großhirn	206565,4531	206,5654531	G051	Kleinhirn	134711	134,711
<b>G052</b>	Großhirn	223989,5156	223,9895156	G052	Kleinhirn	198867,7656	198,8677656
<b>G053</b>	Großhirn	110763,4141	110,7634141	G053	Kleinhirn	181416,5469	181,4165469
<b>G054</b>	Großhirn	98161,3906	98,1613906	G054	Kleinhirn	165189,5156	165,1895156
<b>G055</b>	Großhirn	127235,7422	127,2357422	G055	Kleinhirn	198502,25	198,50225
<b>G056</b>	Großhirn	74597,8594	74,5978594	G056	Kleinhirn	233143,7188	233,1437188
<b>G057</b>	Großhirn	152927,0313	152,9270313	G057	Kleinhirn	131022,875	131,022875
<b>G058</b>	Großhirn	53362,3516	53,3623516	G058	Kleinhirn	87843,2266	87,8432266
<b>G059</b>	Großhirn	282423,5	282,4235	G059	Kleinhirn	305911	305,911
<b>G060</b>	Großhirn	239752,3	239,7523	G060	Kleinhirn	304820,1	304,8201
<b>G061</b>	Großhirn	378548,4	378,5484	G061	Kleinhirn	279609,2	279,6092
<b>G062</b>	Großhirn	373218,2	373,2182	G062	Kleinhirn	250611,1	250,6111
<b>G063</b>	Großhirn	378124,2	378,1242	G063	Kleinhirn	329152,8	329,1528
<b>G064</b>	Großhirn	249737,6	249,7376	G064	Kleinhirn	313595	313,595
<b>G065</b>	Großhirn	203829,3	203,8293	G065	Kleinhirn	228495,8	228,4958
<b>G066</b>	Großhirn	291397,6	291,3976	G066	Kleinhirn	305937,3	305,9373
<b>G067</b>	Großhirn	425656,3	425,6563	G067	Kleinhirn	325954,3	325,9543
<b>G068</b>	Großhirn	423778,2	423,7782	G068	Kleinhirn	370077,8	370,0778
<b>G069</b>	Großhirn	207601,5	207,6015	G069	Kleinhirn	198487,8	198,4878
<b>G070</b>	Großhirn	160780	160,78	G070	Kleinhirn	274099,1	274,0991
<b>G071</b>	Großhirn	247677,9	247,6779	G071	Kleinhirn	192309,4	192,3094
<b>G072</b>	Großhirn	191723,4	191,7234	G072	Kleinhirn	273765,4	273,7654
<b>G073</b>	Großhirn	173544	173,544	G073	Kleinhirn	194390	194,39
<b>G074</b>	Großhirn	178016,1	178,0161	G074	Kleinhirn	198402	198,402
<b>G075</b>	Großhirn	228625,6	228,6256	G075	Kleinhirn	226986,1	226,9861
<b>G076</b>	Großhirn	175273,5	175,2735	G076	Kleinhirn	245638	245,638
<b>G077</b>	Großhirn	201539,8	201,5398	G077	Kleinhirn	229743,3	229,7433
<b>G078</b>	Großhirn	229700	229,7	G078	Kleinhirn	240328	240,328
<b>G079</b>	Großhirn	201419,6	201,4196	G079	Kleinhirn	319593,6	319,5936
<b>G080</b>	Großhirn	202238,8	202,2388	G080	Kleinhirn	278563,3	278,5633
<b>G081</b>	Großhirn	211399,8	211,3998	G081	Kleinhirn	256960,4	256,9604
<b>G082</b>	Großhirn	266136,4	266,1364	G082	Kleinhirn	304377,1	304,3771
<b>G083</b>	Großhirn	272863,9	272,8639	G083	Kleinhirn	360366,8	360,3668
<b>G084</b>	Großhirn	217532,3	217,5323	G084	Kleinhirn	391897,2	391,8972

## Anhang

<b>G085</b>	Großhirn	282905,6	282,9056	G085	Kleinhirn	361764,4	361,7644
<b>G086</b>	Großhirn	233550,3	233,5503	G086	Kleinhirn	278944	278,944
<b>G087</b>	Großhirn	231950,3	231,9503	G087	Kleinhirn	284255,8	284,2558
<b>G088</b>	Großhirn	298585,4	298,5854	G088	Kleinhirn	311086,2	311,0862
<b>G089</b>	Großhirn	291149,2	291,1492	G089	Kleinhirn	333460,8	333,4608
<b>G090</b>	Großhirn	185717,7	185,7177	G090	Kleinhirn	308026,9	308,0269
<b>G091</b>	Großhirn	196392	196,392	G091	Kleinhirn	227176,3	227,1763
<b>G092</b>	Großhirn	238691	238,691	G092	Kleinhirn	227356,5	227,3565
<b>G093</b>	Großhirn	244150,2	244,1502	G093	Kleinhirn	214292	214,292
<b>G094</b>	Großhirn	257829	257,829	G094	Kleinhirn	298616	298,616
<b>G095</b>	Großhirn	273787,8	273,7878	G095	Kleinhirn	307238	307,238
<b>G096</b>	Großhirn	340238	340,238	G096	Kleinhirn	318827,2	318,8272
<b>G097</b>	Großhirn	292935,9	292,9359	G097	Kleinhirn	330908,1	330,9081
<b>G098</b>	Großhirn	255599,2	255,5992	G098	Kleinhirn	287889	287,889
<b>G099</b>	Großhirn	284425,3	284,4253	G099	Kleinhirn	335845,7	335,8457
<b>G100</b>	Großhirn	334951,3	334,9513	G100	Kleinhirn	303401	303,401

## Anhang

**Tabelle 19: Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) im Mark des Groß- und Kleinhirns. Mit Angabe der Umrechnung in  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .**

Probennr.	Gewebe	Konzentration $\mu\text{g} / \text{ml}$	Konzentration $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	Probennr.	Gewebe	Konzentration $\mu\text{g} / \text{ml}$	Konzentration $\mu\text{g} / \mu\text{l}$
G001	Großhirn	171060,1719	171,0601719	G001	Kleinhirn	151866,375	151,866375
G002	Großhirn	154380,3906	154,3803906	G002	Kleinhirn	175611,4375	175,6114375
G003	Großhirn	159984,9688	159,9849688	G003	Kleinhirn	106105,0469	106,1050469
G004	Großhirn	144166,0469	144,1660469	G004	Kleinhirn	163125,8281	163,1258281
G005	Großhirn	212049,531	212,049531	G005	Kleinhirn	114256,2969	114,2562969
G006	Großhirn	127837,1328	127,8371328	G006	Kleinhirn	134759,2969	134,7592969
G007	Großhirn	156446,4219	156,4464219	G007	Kleinhirn	172784,5938	172,7845938
G008	Großhirn	188115,75	188,11575	G008	Kleinhirn	154789,0625	154,7890625
G009	Großhirn	181145,4688	181,1454688	G009	Kleinhirn	144722,8594	144,7228594
G010	Großhirn	163868,5469	163,8685469	G010	Kleinhirn	225707,8906	225,7078906
G011	Großhirn	225580,375	225,580375	G011	Kleinhirn	149147,6719	149,1476719
G012	Großhirn	119849,7344	119,8497344	G012	Kleinhirn	217568,7656	217,5687656
G013	Großhirn	235930,375	235,930375	G013	Kleinhirn	186474,5	186,4745
G014	Großhirn	259042,9375	259,0429375	G014	Kleinhirn	130004,7188	130,0047188
G015	Großhirn	164641,5313	164,6415313	G015	Kleinhirn	187100,3438	187,1003438
G016	Großhirn	214889,3125	214,8893125	G016	Kleinhirn	194184,8438	194,1848438
G017	Großhirn	214085,3906	214,0853906	G017	Kleinhirn	215781,4531	215,7814531
G018	Großhirn	269368,5625	269,3685625	G018	Kleinhirn	240525,9688	240,5259688
G019	Großhirn	211496,9688	211,4969688	G019	Kleinhirn	200732,4531	200,7324531
G020	Großhirn	236429,1094	236,4291094	G020	Kleinhirn	219741,4844	219,7414844
G021	Großhirn	221733,3906	221,7333906	G021	Kleinhirn	233768,875	233,768875
G022	Großhirn	132918,7344	132,9187344	G022	Kleinhirn	173039,2813	173,0392813
G023	Großhirn	118863,9844	118,8639844	G023	Kleinhirn	115207,3203	115,2073203
G024	Großhirn	188470,9063	188,4709063	G024	Kleinhirn	156121,9844	156,1219844
G025	Großhirn	124741,6484	124,7416484	G025	Kleinhirn	89650,2344	89,6502344
G026	Großhirn	126455,4375	126,4554375	G026	Kleinhirn	128674,8047	128,6748047
G027	Großhirn	92258,8516	92,2588516	G027	Kleinhirn	121716,7422	121,7167422
G028	Großhirn	127699,1797	127,6991797	G028	Kleinhirn	130214,6328	130,2146328
G029	Großhirn	139784,6875	139,7846875	G029	Kleinhirn	162879,5625	162,8795625
G030	Großhirn	189531,6875	189,5316875	G030	Kleinhirn	104512,3047	104,5123047
G031	Großhirn	200519,3125	200,5193125	G031	Kleinhirn	196313,2031	196,3132031
G032	Großhirn	169218,5625	169,2185625	G032	Kleinhirn	173388,4219	173,3884219
G033	Großhirn	128457,8984	128,4578984	G033	Kleinhirn	149378,8125	149,3788125
G034	Großhirn	271909,1875	271,9091875	G034	Kleinhirn	215420,4063	215,4204063
G035	Großhirn	281315,5625	281,3155625	G035	Kleinhirn	256353,2656	256,3532656
G036	Großhirn	249251,3438	249,2513438	G036	Kleinhirn	276453,75	276,45375
G037	Großhirn	169815,25	169,81525	G037	Kleinhirn	235130,5625	235,1305625
G038	Großhirn	249717,5	249,7175	G038	Kleinhirn	245551,4844	245,5514844
G039	Großhirn	165528,9688	165,5289688	G039	Kleinhirn	216944,3125	216,9443125
G040	Großhirn	226142,0781	226,1420781	G040	Kleinhirn	220755,25	220,75525

## Anhang

<b>G041</b>	Großhirn	240414,6719	240,4146719	G041	Kleinhirn	176151,5625	176,1515625
<b>G042</b>	Großhirn	193124,7188	193,1247188	G042	Kleinhirn	158859,0938	158,8590938
<b>G043</b>	Großhirn	228200,0156	228,2000156	G043	Kleinhirn	136882,4375	136,8824375
<b>G044</b>	Großhirn	140886,7813	140,8867813	G044	Kleinhirn	174364,3125	174,3643125
<b>G045</b>	Großhirn	117985,2109	117,9852109	G045	Kleinhirn	188183,7969	188,1837969
<b>G046</b>	Großhirn	225521,4531	225,5214531	G046	Kleinhirn	175046,0153	175,0460153
<b>G047</b>	Großhirn	150730,6875	150,7306875	G047	Kleinhirn	209940,7669	209,9407669
<b>G048</b>	Großhirn	169288,2656	169,2882656	G048	Kleinhirn	221461,2656	221,4612656
<b>G049</b>	Großhirn	153850,5938	153,8505938	G049	Kleinhirn	205403,7656	205,4037656
<b>G050</b>	Großhirn	190109,8281	190,1098281	G050	Kleinhirn	211871,75	211,87175
<b>G051</b>	Großhirn	226989,75	226,98975	G051	Kleinhirn	255126,9219	255,1269219
<b>G052</b>	Großhirn	227854,6563	227,8546563	G052	Kleinhirn	229301,0938	229,3010938
<b>G053</b>	Großhirn	212357,4688	212,3574688	G053	Kleinhirn	252370,4375	252,3704375
<b>G054</b>	Großhirn	228702,625	228,702625	G054	Kleinhirn	294393,8125	294,3938125
<b>G055</b>	Großhirn	223806,6563	223,8066563	G055	Kleinhirn	267142,0313	267,1420313
<b>G056</b>	Großhirn	233829,0313	233,8290313	G056	Kleinhirn	257279,0625	257,2790625
<b>G057</b>	Großhirn	188857,5313	188,8575313	G057	Kleinhirn	189247,5156	189,2475156
<b>G058</b>	Großhirn	203320,3906	203,3203906	G058	Kleinhirn	299724,9375	299,7249375
<b>G059</b>	Großhirn	240008,2188	240,0082188	G059	Kleinhirn	242895,7031	242,8957031
<b>G060</b>	Großhirn	219227,6094	219,2276094	G060	Kleinhirn	277873,4688	277,8734688
<b>G061</b>	Großhirn	293054,9063	293,0549063	G061	Kleinhirn	228489,5313	228,4895313
<b>G062</b>	Großhirn	254878,4063	254,8784063	G062	Kleinhirn	200571,5156	200,5715156
<b>G063</b>	Großhirn	213009,625	213,009625	G063	Kleinhirn	204117,1094	204,1171094
<b>G064</b>	Großhirn	168675,6875	168,6756875	G064	Kleinhirn	236687,625	236,687625
<b>G065</b>	Großhirn	175394,375	175,394375	G065	Kleinhirn	182036,7656	182,0367656
<b>G066</b>	Großhirn	213678,875	213,678875	G066	Kleinhirn	207148,5469	207,1485469
<b>G067</b>	Großhirn	165886,2188	165,8862188	G067	Kleinhirn	231546,3906	231,5463906
<b>G068</b>	Großhirn	220616,7656	220,6167656	G068	Kleinhirn	199837,2344	199,8372344
<b>G069</b>	Großhirn	176237,7031	176,2377031	G069	Kleinhirn	104149,8125	104,1498125
<b>G070</b>	Großhirn	187705,6875	187,7056875	G070	Kleinhirn	165992,8125	165,9928125
<b>G071</b>	Großhirn	193092,6719	193,0926719	G071	Kleinhirn	165826,3438	165,8263438
<b>G072</b>	Großhirn	235623,5	235,6235	G072	Kleinhirn	151007,7031	151,0077031
<b>G073</b>	Großhirn	152608,2813	152,6082813	G073	Kleinhirn	154445,1406	154,4451406
<b>G074</b>	Großhirn	192776,5469	192,7765469	G074	Kleinhirn	157907,7188	157,9077188
<b>G075</b>	Großhirn	155148,4219	155,1484219	G075	Kleinhirn	182325,375	182,325375
<b>G076</b>	Großhirn	186201,7813	186,2017813	G076	Kleinhirn	185457,2188	185,4572188
<b>G077</b>	Großhirn	177341,5625	177,3415625	G077	Kleinhirn	220449,3438	220,4493438
<b>G078</b>	Großhirn	226662,4688	226,6624688	G078	Kleinhirn	137037,4219	137,0374219
<b>G079</b>	Großhirn	191824,7656	191,8247656	G079	Kleinhirn	182672,6563	182,6726563
<b>G080</b>	Großhirn	148472,25	148,47225	G080	Kleinhirn	188535,9688	188,5359688
<b>G081</b>	Großhirn	156056,0313	156,0560313	G081	Kleinhirn	236468,5625	236,4685625
<b>G082</b>	Großhirn	186118,5781	186,1185781	G082	Kleinhirn	203732,875	203,732875
<b>G083</b>	Großhirn	230754,3591	230,7543591	G083	Kleinhirn	215353,2813	215,3532813
<b>G084</b>	Großhirn	160037,8281	160,0378281	G084	Kleinhirn	228140,7344	228,1407344

## Anhang

<b>G085</b>	Großhirn	194173,5625	194,1735625	G085	Kleinhirn	163625,7813	163,6257813
<b>G086</b>	Großhirn	152731,1406	152,7311406	G086	Kleinhirn	220229,1094	220,2291094
<b>G087</b>	Großhirn	214007,7813	214,0077813	G087	Kleinhirn	186764	186,764
<b>G088</b>	Großhirn	164297,7188	164,2977188	G088	Kleinhirn	222651,0156	222,6510156
<b>G089</b>	Großhirn	197350,0625	197,3500625	G089	Kleinhirn	229136,9688	229,1369688
<b>G090</b>	Großhirn	142828,1094	142,8281094	G090	Kleinhirn	168307,5313	168,3075313
<b>G091</b>	Großhirn	128746,2266	128,7462266	G091	Kleinhirn	211065,1563	211,0651563
<b>G092</b>	Großhirn	157022,4063	157,0224063	G092	Kleinhirn	215862,2344	215,8622344
<b>G093</b>	Großhirn	201424,5	201,4245	G093	Kleinhirn	226631,4688	226,6314688
<b>G094</b>	Großhirn	206685,9219	206,6859219	G094	Kleinhirn	181398,5313	181,3985313
<b>G095</b>	Großhirn	176455,4375	176,4554375	G095	Kleinhirn	186068	186,068
<b>G096</b>	Großhirn	251161,3281	251,1613281	G096	Kleinhirn	263660,875	263,660875
<b>G097</b>	Großhirn	171467,2344	171,4672344	G097	Kleinhirn	298166,1563	298,1661563
<b>G098</b>	Großhirn	182117,6094	182,1176094	G098	Kleinhirn	206277,9063	206,2779063
<b>G099</b>	Großhirn	193628,4063	193,6284063	G099	Kleinhirn	198197,7969	198,1977969
<b>G100</b>	Großhirn	164643,6406	164,6436406	G100	Kleinhirn	159019,375	159,019375

## Anhang

**Tabelle 20: Mit der Software Membralyzer® bestimmte Stressprotein Konzentration im Kleinhirngewebe und Großhirn (Rinde).**

Probennr.	Gewebe	Konzentration an HSPA8 µg / µl	Konzentration an HSPA1A µg / µl	Probennr.	Gewebe	Konzentration an HSPA8 µg / µl	Konzentration an HSPA1A µg / µl
G001	Großhirn	5,66	4,07	G001	Kleinhirn	9,39	3,96
G002	Großhirn	5,77	3,4	G002	Kleinhirn	11,43	4,19
G003	Großhirn	28,29	21,28	G003	Kleinhirn	27,73	7,92
G004	Großhirn	9,05	7,92	G004	Kleinhirn	23,77	4,53
G005	Großhirn	12,45	10,41	G005	Kleinhirn	28,29	6,79
G006	Großhirn	26,03	19,24	G006	Kleinhirn	18,33	6,22
G007	Großhirn	16,98	5,09	G007	Kleinhirn	19,24	7,92
G008	Großhirn	3,51	2,83	G008	Kleinhirn	27,16	0,11
G009	Großhirn	4,07	3,4	G009	Kleinhirn	28,86	0,11
G010	Großhirn	7,92	6	G010	Kleinhirn	14,71	1,36
G011	Großhirn	1,92	2,49	G011	Kleinhirn	13,01	6,22
G012	Großhirn	10,75	8,6	G012	Kleinhirn	23,31	9,62
G013	Großhirn	3,4	3,62	G013	Kleinhirn	6,9	0,91
G014	Großhirn	10,3	5,43	G014	Kleinhirn	16,41	12,22
G015	Großhirn	20,37	16,98	G015	Kleinhirn	11,32	12,45
G016	Großhirn	1,92	1,47	G016	Kleinhirn	1,92	1,47
G017	Großhirn	2,26	1,81	G017	Kleinhirn	4,3	1,13
G018	Großhirn	3,62	3,4	G018	Kleinhirn	6,22	4,53
G019	Großhirn	3,17	3,85	G019	Kleinhirn	5,66	5,66
G020	Großhirn	18,11	8,83	G020	Kleinhirn	26,03	12,45
G021	Großhirn	7,92	4,3	G021	Kleinhirn	7,7	5,88
G022	Großhirn	3,4	2,72	G022	Kleinhirn	11,43	6,79
G023	Großhirn	20,71	14,71	G023	Kleinhirn	20,94	7,92
G024	Großhirn	24,9	20,37	G024	Kleinhirn	7,7	4,07
G025	Großhirn	3,62	2,72	G025	Kleinhirn	4,75	3,4
G026	Großhirn	8,71	7,36	G026	Kleinhirn	24,78	9,62
G027	Großhirn	9,73	8,15	G027	Kleinhirn	19,24	6,22
G028	Großhirn	12,56	9,28	G028	Kleinhirn	27,16	9,96
G029	Großhirn	5,88	4,87	G029	Kleinhirn	10,75	5,09
G030	Großhirn	20,94	16,3	G030	Kleinhirn	26,59	9,73
G031	Großhirn	28,29	21,5	G031	Kleinhirn	26,03	7,36
G032	Großhirn	19,24	15,84	G032	Kleinhirn	25,46	9,62
G033	Großhirn	23,2	20,37	G033	Kleinhirn	26,03	9,96
G034	Großhirn	20,94	16,52	G034	Kleinhirn	15,28	3,96
G035	Großhirn	7,81	5,09	G035	Kleinhirn	8,71	2,26
G036	Großhirn	9,62	6,34	G036	Kleinhirn	27,16	5,09
G037	Großhirn	3,96	1,02	G037	Kleinhirn	16,41	4,53
G038	Großhirn	1,47	0,68	G038	Kleinhirn	20,37	5,66
G039	Großhirn	10,07	0,23	G039	Kleinhirn	24,9	5,09

## Anhang

<b>G040</b>	Großhirn	1,13	0,57
<b>G041</b>	Großhirn	2,83	0,11
<b>G042</b>	Großhirn	1,7	0,68
<b>G043</b>	Großhirn	7,58	6,22
<b>G044</b>	Großhirn	7,13	3,51
<b>G045</b>	Großhirn	13,69	5,88
<b>G046</b>	Großhirn	7,02	2,83
<b>G047</b>	Großhirn	11,32	4,07
<b>G048</b>	Großhirn	12,34	5,88
<b>G049</b>	Großhirn	14,15	6,22
<b>G050</b>	Großhirn	10,19	4,75
<b>G051</b>	Großhirn	23,77	7,36
<b>G052</b>	Großhirn	28,29	10,3
<b>G053</b>	Großhirn	5,09	2,6
<b>G054</b>	Großhirn	3,96	2,38
<b>G055</b>	Großhirn	5,66	2,26
<b>G056</b>	Großhirn	2,04	1,13
<b>G057</b>	Großhirn	4,53	5,88
<b>G058</b>	Großhirn	5,43	4,41
<b>G059</b>	Großhirn	7,7	1,76
<b>G060</b>	Großhirn	6,1	3,21
<b>G061</b>	Großhirn	11,39	2,73
<b>G062</b>	Großhirn	12,03	4,01
<b>G063</b>	Großhirn	7,06	1,76
<b>G064</b>	Großhirn	9,47	1,28
<b>G065</b>	Großhirn	7,7	1,12
<b>G066</b>	Großhirn	10,59	4,33
<b>G067</b>	Großhirn	10,59	3,85
<b>G068</b>	Großhirn	6,26	3,21
<b>G069</b>	Großhirn	18,13	8,66
<b>G070</b>	Großhirn	19,74	6,9
<b>G071</b>	Großhirn	4,81	1,28
<b>G072</b>	Großhirn	9,31	1,6
<b>G073</b>	Großhirn	4,97	1,12
<b>G074</b>	Großhirn	9,31	3,53
<b>G075</b>	Großhirn	5,78	1,28
<b>G076</b>	Großhirn	12,19	1,93
<b>G077</b>	Großhirn	3,53	2,25
<b>G078</b>	Großhirn	12,84	7,06
<b>G079</b>	Großhirn	5,62	3,53
<b>G080</b>	Großhirn	2,41	1,6
<b>G081</b>	Großhirn	8,18	4,49
<b>G082</b>	Großhirn	4,01	2,73
<b>G083</b>	Großhirn	3,37	1,76

G040	Kleinhirn	21,5	6,22
G041	Kleinhirn	18,67	4,53
G042	Kleinhirn	19,8	7,36
G043	Kleinhirn	4,75	3,96
G044	Kleinhirn	16,98	6,56
G045	Kleinhirn	26,03	16,98
G046	Kleinhirn	22,63	10,41
G047	Kleinhirn	26,03	12,45
G048	Kleinhirn	24,9	11,32
G049	Kleinhirn	26,03	15,84
G050	Kleinhirn	21,5	9,05
G051	Kleinhirn	18,67	9,28
G052	Kleinhirn	26,59	12,45
G053	Kleinhirn	6,22	4,19
G054	Kleinhirn	15,96	6,11
G055	Kleinhirn	12,45	4,53
G056	Kleinhirn	12,68	3,62
G057	Kleinhirn	6,22	4,98
G058	Kleinhirn	15,28	8,15
G059	Kleinhirn	12,03	2,73
G060	Kleinhirn	5,29	0,96
G061	Kleinhirn	8,18	4,81
G062	Kleinhirn	3,53	2,57
G063	Kleinhirn	5,62	1,76
G064	Kleinhirn	4,17	0,64
G065	Kleinhirn	5,29	1,44
G066	Kleinhirn	7,06	3,37
G067	Kleinhirn	12,03	2,73
G068	Kleinhirn	11,07	1,6
G069	Kleinhirn	8,02	1,12
G070	Kleinhirn	8,18	1,44
G071	Kleinhirn	12,03	2,25
G072	Kleinhirn	6,9	1,12
G073	Kleinhirn	4,81	1,28
G074	Kleinhirn	13,48	2,89
G075	Kleinhirn	5,29	3,69
G076	Kleinhirn	3,69	2,73
G077	Kleinhirn	4,01	3,05
G078	Kleinhirn	10,43	7,22
G079	Kleinhirn	8,18	3,53
G080	Kleinhirn	8,82	5,94
G081	Kleinhirn	3,21	2,57
G082	Kleinhirn	5,46	2,41
G083	Kleinhirn	5,94	1,6

## Anhang

<b>G084</b>	Großhirn	3,53	1,76	G084	Kleinhirn	5,46	1,44
<b>G085</b>	Großhirn	5,78	2,41	G085	Kleinhirn	5,46	1,44
<b>G086</b>	Großhirn	6,1	2,41	G086	Kleinhirn	7,06	3,53
<b>G087</b>	Großhirn	5,46	2,25	G087	Kleinhirn	2,73	1,44
<b>G088</b>	Großhirn	2,41	1,44	G088	Kleinhirn	5,13	1,76
<b>G089</b>	Großhirn	4,33	2,09	G089	Kleinhirn	11,87	7,22
<b>G090</b>	Großhirn	2,57	1,76	G090	Kleinhirn	11,55	5,62
<b>G091</b>	Großhirn	6,74	4,01	G091	Kleinhirn	4,49	3,37
<b>G092</b>	Großhirn	3,21	2,25	G092	Kleinhirn	9,79	6,9
<b>G093</b>	Großhirn	11,23	4,97	G093	Kleinhirn	4,81	2,73
<b>G094</b>	Großhirn	10,43	5,78	G094	Kleinhirn	12,52	4,81
<b>G095</b>	Großhirn	4,65	2,25	G095	Kleinhirn	9,63	3,05
<b>G096</b>	Großhirn	12,03	3,85	G096	Kleinhirn	8,66	4,49
<b>G097</b>	Großhirn	10,59	3,37	G097	Kleinhirn	15,56	6,58
<b>G098</b>	Großhirn	3,85	2,25	G098	Kleinhirn	12,35	4,33
<b>G099</b>	Großhirn	19,9	9,95	G099	Kleinhirn	24,7	16,69
<b>G100</b>	Großhirn	13,8	5,62	G100	Kleinhirn	16,85	7,22

## Anhang

**Tabelle 21: Mittels RT-qPCR bestimmte Menge nukleärer DNA im Großhirngewebe (Rinde).**  
Werte mit mehr als 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probennr.	Gewebe	Messung 1 (ng / 2 µl)	Messung 2 (ng / 2 µl)	Messung 3 (ng / 2 µl)	Mittelwert (ng / µl)	Standardabweichung (ng / µl)
G001	Großhirn		29,76	25,42	<b>137,95</b>	2,1700
G002	Großhirn	31,58	31,5	35,64	<b>164,53</b>	1,9330
G003	Großhirn	17,72	16,09	14,37	<b>80,30</b>	1,3678
G004	Großhirn		8,88	7,84	<b>41,80</b>	0,5200
G005	Großhirn	8,55	8,17		<b>41,80</b>	0,1900
G006	Großhirn	4,06		3,85	<b>19,78</b>	0,1050
G007	Großhirn	16,85	15,88		<b>81,83</b>	0,4850
G008	Großhirn	12,1		11,47	<b>58,93</b>	0,3150
G009	Großhirn	6,64	6,79		<b>33,58</b>	0,0750
G010	Großhirn	4,26	3,78		<b>20,10</b>	0,2400
G011	Großhirn	56,59	47,48		<b>260,18</b>	4,5550
G012	Großhirn		10,41	9,79	<b>50,50</b>	0,3100
G013	Großhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G014	Großhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G015	Großhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G016	Großhirn	14,77	14,04		<b>72,03</b>	0,3650
G017	Großhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G018	Großhirn	11,38	9,02	11,14	<b>52,57</b>	1,0605
G019	Großhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G020	Großhirn	0,326		0,301	<b>1,57</b>	0,0125
G021	Großhirn	0,0824		0,0702	<b>0,38</b>	0,0061
G022	Großhirn	5,66	5,54	6,03	<b>28,72</b>	0,2085
G023	Großhirn	4,46	3,88	4,06	<b>20,67</b>	0,2424
G024	Großhirn	0,671	0,793		<b>3,66</b>	0,0610
G025	Großhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G026	Großhirn	0,0293		0,0322	<b>0,15</b>	0,0015
G027	Großhirn	0,0412	0,0463	0,0411	<b>0,21</b>	0,0024
G028	Großhirn	24,61	20,42		<b>112,58</b>	2,0950
G029	Großhirn	7,87	7,7		<b>38,93</b>	0,0850
G030	Großhirn	4,52	4,08		<b>21,50</b>	0,2200
G031	Großhirn	14,46		14,25	<b>71,78</b>	0,1050
G032	Großhirn	5,07	4,76		<b>24,58</b>	0,1550
G033	Großhirn	9,44	9,32		<b>46,90</b>	0,0600
G034	Großhirn	8,34	8,55	7,35	<b>40,40</b>	0,5233
G035	Großhirn	38,96	34		<b>182,40</b>	2,4800
G036	Großhirn	12,69	14		<b>66,73</b>	0,6550
G037	Großhirn	131,93	115,21		<b>617,85</b>	8,3600
G038	Großhirn	40,06	34,55		<b>186,53</b>	2,7550
G039	Großhirn	24,91	18,73	22,33	<b>109,95</b>	2,5344
G040	Großhirn	16,14	16,92		<b>82,65</b>	0,3900
G041	Großhirn	14,26	14,46		<b>71,80</b>	0,1000

## Anhang

<b>G042</b>	Großhirn	32,57		37,8	<b>175,93</b>	2,6150
<b>G043</b>	Großhirn	1,01		1,28	<b>5,73</b>	0,1350
<b>G044</b>	Großhirn	9,17	8,14	8,26	<b>42,62</b>	0,4599
<b>G045</b>	Großhirn	6,84	7,01		<b>34,63</b>	0,0850
<b>G046</b>	Großhirn	10,21	12,36		<b>56,43</b>	1,0750
<b>G047</b>	Großhirn	12,78	9,94		<b>56,80</b>	1,4200
<b>G048</b>	Großhirn	27,24	33,33		<b>151,43</b>	3,0450
<b>G049</b>	Großhirn	21,11	21,72		<b>107,08</b>	0,3050
<b>G050</b>	Großhirn	11,89	10,85		<b>56,85</b>	0,5200
<b>G051</b>	Großhirn	14,99	14,85		<b>74,60</b>	0,0700
<b>G052</b>	Großhirn	64,77	71,77	87,25	<b>372,98</b>	9,3926
<b>G053</b>	Großhirn	18,18	17,96		<b>90,35</b>	0,1100
<b>G054</b>	Großhirn	28,33	34,98		<b>158,28</b>	3,3250
<b>G055</b>	Großhirn	30,51		36,19	<b>166,75</b>	2,8400
<b>G056</b>	Großhirn	65,14	69,05	77,64	<b>353,05</b>	5,2210
<b>G057</b>	Großhirn	16,24	16,91		<b>82,88</b>	0,3350
<b>G058</b>	Großhirn	20,4	20,92	23,81	<b>108,55</b>	1,5000
<b>G059</b>	Großhirn	92,3		109,83	<b>505,33</b>	8,7650
<b>G060</b>	Großhirn	76,73	79,61	81,69	<b>396,72</b>	2,0337
<b>G061</b>	Großhirn	43,16	40,97	41,73	<b>209,77</b>	0,9079
<b>G062</b>	Großhirn	59,37	46,69	58,56	<b>274,37</b>	5,7959
<b>G063</b>	Großhirn		87,9	74,51	<b>406,03</b>	6,6950
<b>G064</b>	Großhirn		66,97	56,93	<b>309,75</b>	5,0200
<b>G065</b>	Großhirn	51,13	48,39	56,59	<b>260,18</b>	3,4085
<b>G066</b>	Großhirn	69,39	53,63	64,36	<b>312,30</b>	6,5728
<b>G067</b>	Großhirn	62,43	63,03	60,32	<b>309,63</b>	1,1622
<b>G068</b>	Großhirn		90,7	103,36	<b>485,15</b>	6,3300
<b>G069</b>	Großhirn		71,41	73,62	<b>362,58</b>	1,1050
<b>G070</b>	Großhirn	83,12	67,15	71,97	<b>370,40</b>	6,6883
<b>G071</b>	Großhirn	55,84		82,88	<b>346,80</b>	13,5200
<b>G072</b>	Großhirn		49,42	59,75	<b>272,93</b>	5,1650
<b>G073</b>	Großhirn	50,19		55,41	<b>264,00</b>	2,6100
<b>G074</b>	Großhirn	128,55	122,31	127,37	<b>630,38</b>	2,7067
<b>G075</b>	Großhirn	71,12	69,49	71,23	<b>353,07</b>	0,7956
<b>G076</b>	Großhirn	73,2	73,59	64,99	<b>352,97</b>	3,9654
<b>G077</b>	Großhirn		88,04	99,93	<b>469,93</b>	5,9450
<b>G078</b>	Großhirn		110,15	98,16	<b>520,78</b>	5,9950
<b>G079</b>	Großhirn	106,63	92,4	95,72	<b>491,25</b>	6,0786
<b>G080</b>	Großhirn	66,13		79,48	<b>364,03</b>	6,6750
<b>G081</b>	Großhirn	95,58		98,58	<b>485,40</b>	1,5000
<b>G082</b>	Großhirn	95,22	93,1	97,35	<b>476,12</b>	1,7351
<b>G083</b>	Großhirn	74,35	78,04	70,51	<b>371,50</b>	3,0743
<b>G084</b>	Großhirn		104,31	105,8	<b>525,28</b>	0,7450
<b>G085</b>	Großhirn		101,34	82,13	<b>458,68</b>	9,6050
<b>G086</b>	Großhirn	92,47	98,25	109,99	<b>501,18</b>	7,2892

## Anhang

<b>G087</b>	Großhirn	83,51	82,41		<b>414,80</b>	0,5500
<b>G088</b>	Großhirn	87,97	94,35	88,3	<b>451,03</b>	2,9329
<b>G089</b>	Großhirn	182,91	191,78		<b>936,73</b>	4,4350
<b>G090</b>	Großhirn	74,15	66,25		<b>351,00</b>	3,9500
<b>G091</b>	Großhirn	87,32	73,78	67,64	<b>381,23</b>	8,2215
<b>G092</b>	Großhirn	120,71	118,63	112,89	<b>587,05</b>	3,3070
<b>G093</b>	Großhirn		78,79	69,85	<b>371,60</b>	4,4700
<b>G094</b>	Großhirn		93,38	90,92	<b>460,75</b>	1,2300
<b>G095</b>	Großhirn	220,95	201,86		<b>1057,03</b>	9,5450
<b>G096</b>	Großhirn	290,71	228,85	262,57	<b>1303,55</b>	25,2885
<b>G097</b>	Großhirn	223,89		228,23	<b>1130,30</b>	2,1700
<b>G098</b>	Großhirn	80,3	89,84	96,39	<b>444,22</b>	6,6064
<b>G099</b>	Großhirn	197,97	116,91		<b>787,20</b>	40,5300
<b>G100</b>	Großhirn		178,24	190,2	<b>921,10</b>	5,9800

## Anhang

**Tabelle 22: Mittels RT-qPCR bestimmte Menge nukleärer DNA im Kleinhirngewebe (Rinde).**  
Werte mit mehr als 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probennr.	Gewebe	Messung 1 (ng / 2 µl)	Messung 2 (ng / 2 µl)	Messung 3 (ng / 2 µl)	Mittelwert (ng / µl)	Standardabweichung (ng / µl)
G001	Kleinhirn		3,45	3,83	<b>18,20</b>	0,1900
G002	Kleinhirn		16,61	14,2	<b>77,03</b>	1,2050
G003	Kleinhirn	4,59		3,71	<b>20,75</b>	0,4400
G004	Kleinhirn	104,77	90,24		<b>487,53</b>	7,2650
G005	Kleinhirn		39,74	38,54	<b>195,70</b>	0,6000
G006	Kleinhirn	16,95	17,08	19,88	<b>89,85</b>	1,3516
G007	Kleinhirn	143,27	123,7		<b>667,43</b>	9,7850
G008	Kleinhirn	248,22	249,75	264,46	<b>1285,53</b>	7,3217
G009	Kleinhirn	2,84	2,01	2,43	<b>11,10</b>	0,3389
G010	Kleinhirn	0,0649	0,055	0,0522	<b>0,29</b>	0,0054
G011	Kleinhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G012	Kleinhirn		0,399	0,423	<b>2,06</b>	0,0120
G013	Kleinhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	
G014	Kleinhirn	6,03	7,82		<b>34,63</b>	0,8950
G015	Kleinhirn		2,19	2,54	<b>11,83</b>	0,1750
G016	Kleinhirn	1,67		1,79	<b>8,65</b>	0,0600
G017	Kleinhirn	10,61	12,62	12,39	<b>59,37</b>	0,8982
G018	Kleinhirn	0,221	0,24		<b>1,15</b>	0,0095
G019	Kleinhirn	2,6		2,27	<b>12,18</b>	0,1650
G020	Kleinhirn	2,58	2,56		<b>12,85</b>	0,0100
G021	Kleinhirn		6,55	7,64	<b>35,48</b>	0,5450
G022	Kleinhirn	1,62		1,83	<b>8,63</b>	0,1050
G023	Kleinhirn	3,73	3,67		<b>18,50</b>	0,0300
G024	Kleinhirn		13,03	15,4	<b>71,08</b>	1,1850
G025	Kleinhirn		9,6	7,74	<b>43,35</b>	0,9300
G026	Kleinhirn	14,03	12,61		<b>66,60</b>	0,7100
G027	Kleinhirn	7,48	6,7		<b>35,45</b>	0,3900
G028	Kleinhirn	8,42		9,71	<b>45,33</b>	0,6450
G029	Kleinhirn	9,32	8,43	7,85	<b>42,67</b>	0,6046
G030	Kleinhirn	13,5	14,63	13,5	<b>69,38</b>	0,5327
G031	Kleinhirn	15,3	12,73		<b>70,08</b>	1,2850
G032	Kleinhirn	14,92	14,95	13,77	<b>72,73</b>	0,5493
G033	Kleinhirn	18,2		18,4	<b>91,50</b>	0,1000
G034	Kleinhirn	97,04	116,41	126,14	<b>565,98</b>	12,0954
G035	Kleinhirn		16,1	13,9	<b>75,00</b>	1,1000
G036	Kleinhirn	10,21		11,3	<b>53,78</b>	0,5450
G037	Kleinhirn		55,59	56,84	<b>281,08</b>	0,6250
G038	Kleinhirn	15,67	19,29		<b>87,40</b>	1,8100
G039	Kleinhirn	33,78	31,51		<b>163,23</b>	1,1350
G040	Kleinhirn	7,42	7,38		<b>37,00</b>	0,0200
G041	Kleinhirn	16,41	15,35		<b>79,40</b>	0,5300

## Anhang

<b>G042</b>	Kleinhirn	1,76	1,57		<b>8,33</b>	0,0950
<b>G043</b>	Kleinhirn		10,21	12,31	<b>56,30</b>	1,0500
<b>G044</b>	Kleinhirn	6,11	5,62	4,74	<b>27,45</b>	0,5668
<b>G045</b>	Kleinhirn	33,84		27,07	<b>152,28</b>	3,3850
<b>G046</b>	Kleinhirn	15,31	15,01		<b>75,80</b>	0,1500
<b>G047</b>	Kleinhirn	20,53	18,58	19,4	<b>97,52</b>	0,7994
<b>G048</b>	Kleinhirn	70,61	79,27		<b>374,70</b>	4,3300
<b>G049</b>	Kleinhirn		113,57	92,37	<b>514,85</b>	10,6000
<b>G050</b>	Kleinhirn	179,83	156,2		<b>840,08</b>	11,8150
<b>G051</b>	Kleinhirn	13,96	13,35		<b>68,28</b>	0,3050
<b>G052</b>	Kleinhirn	14,6	12,62	13,97	<b>68,65</b>	0,8260
<b>G053</b>	Kleinhirn	1,77		2,07	<b>9,60</b>	0,1500
<b>G054</b>	Kleinhirn	3,97		3,57	<b>18,85</b>	0,2000
<b>G055</b>	Kleinhirn	1,55	1,29	1,31	<b>6,92</b>	0,1181
<b>G056</b>	Kleinhirn	4,26		5,82	<b>25,20</b>	0,7800
<b>G057</b>	Kleinhirn	7,09	8,3	7,29	<b>37,80</b>	0,5296
<b>G058</b>	Kleinhirn	2,15	2,03	3,24	<b>12,37</b>	0,5443
<b>G059</b>	Kleinhirn	70,36	70,49	69,15	<b>350,00</b>	0,6034
<b>G060</b>	Kleinhirn		26,03	16,17	<b>105,50</b>	4,9300
<b>G061</b>	Kleinhirn	518,15	608,9	650,57	<b>2962,70</b>	55,2841
<b>G062</b>	Kleinhirn	65,34	61,06	52,18	<b>297,63</b>	5,4809
<b>G063</b>	Kleinhirn	377,34	398,6	432,41	<b>2013,92</b>	22,6760
<b>G064</b>	Kleinhirn	287,01	287,97	294,47	<b>1449,08</b>	3,3137
<b>G065</b>	Kleinhirn	44,99	52,24	51,46	<b>247,82</b>	3,2495
<b>G066</b>	Kleinhirn	50,6	58,37		<b>272,43</b>	3,8850
<b>G067</b>	Kleinhirn	70,4	69,34	66,54	<b>343,80</b>	1,6283
<b>G068</b>	Kleinhirn	566,79	504,99	440,87	<b>2521,08</b>	51,4095
<b>G069</b>	Kleinhirn	39,74	38,09	49,33	<b>211,93</b>	4,9557
<b>G070</b>	Kleinhirn		171,16	174,15	<b>863,28</b>	1,4950
<b>G071</b>	Kleinhirn	80,39	100,39	96,14	<b>461,53</b>	2,1250
<b>G072</b>	Kleinhirn	94,75	87,28		<b>455,08</b>	3,7350
<b>G073</b>	Kleinhirn	104,13	108,82	109,76	<b>537,85</b>	2,4625
<b>G074</b>	Kleinhirn		61,71	44,06	<b>264,43</b>	8,8250
<b>G075</b>	Kleinhirn		110,38	105,8	<b>540,45</b>	2,2900
<b>G076</b>	Kleinhirn		1,66	1,42	<b>7,70</b>	0,1200
<b>G077</b>	Kleinhirn	24,31	30,1	26,71	<b>135,20</b>	2,3752
<b>G078</b>	Kleinhirn	156,72	157,35	149,79	<b>773,10</b>	3,4250
<b>G079</b>	Kleinhirn	51,14	53,14	54,76	<b>265,07</b>	1,4806
<b>G080</b>	Kleinhirn	87,35	99,2	99,26	<b>476,35</b>	5,6003
<b>G081</b>	Kleinhirn	397,55	347,46	391,92	<b>1894,88</b>	22,4039
<b>G082</b>	Kleinhirn	145,13	158,43	157,51	<b>768,45</b>	6,0645
<b>G083</b>	Kleinhirn		47,57	44,92	<b>231,23</b>	1,3250
<b>G084</b>	Kleinhirn	39,29	48,31	46,83	<b>224,05</b>	3,9497
<b>G085</b>	Kleinhirn		73,95	63,67	<b>344,05</b>	5,1400
<b>G086</b>	Kleinhirn		33,69	37,92	<b>179,03</b>	2,1150

## Anhang

<b>G087</b>	Kleinhirn	100,23	99,19		<b>498,55</b>	0,5200
<b>G088</b>	Kleinhirn	179,61	185,01	189,38	<b>923,33</b>	3,9960
<b>G089</b>	Kleinhirn		97,51	77,86	<b>438,43</b>	9,8250
<b>G090</b>	Kleinhirn	785,72	703,71		<b>3723,58</b>	41,0050
<b>G091</b>	Kleinhirn	56,76	41,99		<b>246,88</b>	7,3850
<b>G092</b>	Kleinhirn	454,6	327,62		<b>1955,55</b>	63,4900
<b>G093</b>	Kleinhirn		22,28	20,13	<b>106,03</b>	1,0750
<b>G094</b>	Kleinhirn		221,65	217,01	<b>1096,65</b>	2,3200
<b>G095</b>	Kleinhirn	32,71	31,24	39,97	<b>173,20</b>	3,8164
<b>G096</b>	Kleinhirn	11,34	9,96	10,24	<b>52,57</b>	0,5956
<b>G097</b>	Kleinhirn		59,34	64,84	<b>310,45</b>	2,7500
<b>G098</b>	Kleinhirn		159,87	166,23	<b>815,25</b>	3,1800
<b>G099</b>	Kleinhirn	62,41	75,54		<b>344,88</b>	6,5650
<b>G100</b>	Kleinhirn		354,51	322	<b>1691,28</b>	16,2550

## Anhang

**Tabelle 23: Mittels RT-qPCR bestimmte Menge nukleärer DNA im Großhirngewebe (Mark).**  
Werte mit mehr als 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probennr.	Gewebe	Messung 1 (ng / 2 µl)	Messung 2 (ng / 2 µl)	Messung 3 (ng / 2 µl)	Mittelwert (ng / µl)	Standardabweichung (ng / µl)
G001	Großhirn	411,71	517,34		<b>232,26</b>	52,8150
G002	Großhirn	380,97	378,55		<b>189,88</b>	1,2100
G003	Großhirn	175,77	220,56		<b>99,08</b>	22,3950
G004	Großhirn	194,06	177,32		<b>92,85</b>	8,3700
G005	Großhirn	135,89	149,34		<b>713,08</b>	6,7250
G006	Großhirn	49,78	45,96		<b>239,35</b>	1,9100
G007	Großhirn	40,83	41,87		<b>206,75</b>	0,5200
G008	Großhirn	57,92	51,46	42,57	<b>253,25</b>	6,2927
G009	Großhirn		60,43	59,97	<b>301,00</b>	0,2300
G010	Großhirn	105,08	100,08		<b>512,90</b>	2,5000
G011	Großhirn	24,54	23,19		<b>119,33</b>	0,6750
G012	Großhirn	6,43	9,14	8,34	<b>39,85</b>	1,1369
G013	Großhirn		77,52	60,44	<b>344,90</b>	8,5400
G014	Großhirn	205,61		203,9	<b>1023,78</b>	0,8550
G015	Großhirn		13,3	14,71	<b>70,03</b>	0,7050
G016	Großhirn	17,46	22,62	22,99	<b>105,12</b>	2,5242
G017	Großhirn		11,63	9,14	<b>51,93</b>	1,2450
G018	Großhirn		13,48	14,56	<b>70,10</b>	0,5400
G019	Großhirn		11,96	10,64	<b>56,50</b>	0,6600
G020	Großhirn	13,37		13,8	<b>67,93</b>	0,2150
G021	Großhirn	20,89	21,12	22,28	<b>107,15</b>	0,6083
G022	Großhirn	28,67	24,21	25,91	<b>131,32</b>	1,8378
G023	Großhirn	2,81	2,86	2,89	<b>14,27</b>	0,0330
G024	Großhirn		8,72	6,78	<b>38,75</b>	0,9700
G025	Großhirn		59,68	61,49	<b>302,93</b>	0,9050
G026	Großhirn	14,95	13,03		<b>69,95</b>	0,9600
G027	Großhirn	9,99	11,21	8,77	<b>49,95</b>	0,9961
G028	Großhirn	24,32	23,68		<b>120,00</b>	0,3200
G029	Großhirn		53,78	48,93	<b>256,78</b>	2,4250
G030	Großhirn	12,87	17,15	16,98	<b>78,33</b>	1,9788
G031	Großhirn		59,27	61,88	<b>302,88</b>	1,3050
G032	Großhirn	0	0	0	<b>0,00</b>	0,0000
G033	Großhirn	17,71	15,02		<b>81,83</b>	1,3450
G034	Großhirn	42,39		49,34	<b>229,33</b>	3,4750
G035	Großhirn	39,45	39,38	34,17	<b>188,33</b>	2,4727
G036	Großhirn		92,75	97,84	<b>476,48</b>	2,5450
G037	Großhirn	6,16	5,07		<b>28,08</b>	0,5450
G038	Großhirn		27,6	26,34	<b>134,85</b>	0,6300
G039	Großhirn		14,74	13,63	<b>70,93</b>	0,5550
G040	Großhirn	48,37		38,91	<b>218,20</b>	4,7300
G041	Großhirn		71,52	77,03	<b>371,38</b>	2,7550

## Anhang

<b>G042</b>	Großhirn	9,74	8,82	9,89	<b>47,42</b>	0,4730
<b>G043</b>	Großhirn	18,47	20,14		<b>96,53</b>	0,8350
<b>G044</b>	Großhirn		51,2	48,93	<b>250,33</b>	1,1350
<b>G045</b>	Großhirn		7,36	8,95	<b>40,78</b>	0,7950
<b>G046</b>	Großhirn	2,13	1,86		<b>9,98</b>	0,1350
<b>G047</b>	Großhirn		33,16	33,71	<b>167,18</b>	0,2750
<b>G048</b>	Großhirn	5,34	6,69		<b>30,08</b>	0,6750
<b>G049</b>	Großhirn	3,4	3,25	3,05	<b>16,17</b>	0,1434
<b>G050</b>	Großhirn	7,96	7,76		<b>39,30</b>	0,1000
<b>G051</b>	Großhirn		5,74	5,59	<b>28,33</b>	0,0750
<b>G052</b>	Großhirn		5,1	4,91	<b>25,03</b>	0,0950
<b>G053</b>	Großhirn	19,97	17,85		<b>94,55</b>	1,0600
<b>G054</b>	Großhirn	18,35	15,06		<b>83,53</b>	1,6450
<b>G055</b>	Großhirn	47,13	41,84	46,28	<b>225,42</b>	2,3195
<b>G056</b>	Großhirn	118,06	117,4	126,77	<b>603,72</b>	4,2700
<b>G057</b>	Großhirn	33,34	26,86		<b>150,50</b>	3,2400
<b>G058</b>	Großhirn	20,74	25,05	24,17	<b>116,60</b>	1,8594
<b>G059</b>	Großhirn	24,38	17,82		<b>105,50</b>	3,2800
<b>G060</b>	Großhirn	55,1		65,78	<b>302,20</b>	5,3400
<b>G061</b>	Großhirn		13,1	12,36	<b>63,65</b>	0,3700
<b>G062</b>	Großhirn	9,29		11,45	<b>51,85</b>	1,0800
<b>G063</b>	Großhirn	42,63	42,5	43,52	<b>214,42</b>	0,4533
<b>G064</b>	Großhirn	25,67	21,84	23,35	<b>118,10</b>	1,5752
<b>G065</b>	Großhirn	68,18	57,61	59,3	<b>308,48</b>	4,6360
<b>G066</b>	Großhirn		9,13	9,38	<b>46,28</b>	0,1250
<b>G067</b>	Großhirn		26,23	23,75	<b>124,95</b>	1,2400
<b>G068</b>	Großhirn	187,1		184,9	<b>930,00</b>	1,1000
<b>G069</b>	Großhirn	52,54	53,76	47,5	<b>256,33</b>	2,7096
<b>G070</b>	Großhirn	44,59	41,31	43,37	<b>215,45</b>	1,3536
<b>G071</b>	Großhirn		49,31	44,93	<b>235,60</b>	2,1900
<b>G072</b>	Großhirn	106,14	116,82		<b>557,40</b>	5,3400
<b>G073</b>	Großhirn	80,84	84,06		<b>412,25</b>	1,6100
<b>G074</b>	Großhirn	57,15	57,21	55,07	<b>282,38</b>	0,9950
<b>G075</b>	Großhirn	46,76	47,59	42,46	<b>228,02</b>	2,2484
<b>G076</b>	Großhirn	38,74		46,99	<b>214,33</b>	4,1250
<b>G077</b>	Großhirn	36,54	21,17		<b>144,28</b>	7,6850
<b>G078</b>	Großhirn	113,57	101,48	105,15	<b>533,67</b>	5,0611
<b>G079</b>	Großhirn	49,38	53,4	47,58	<b>250,60</b>	2,4329
<b>G080</b>	Großhirn		27,25	29	<b>140,63</b>	0,8750
<b>G081</b>	Großhirn		11,24	9,58	<b>52,05</b>	0,8300
<b>G082</b>	Großhirn	55,24	50,25	56,68	<b>270,28</b>	2,7552
<b>G083</b>	Großhirn		17,33	17,88	<b>88,03</b>	0,2750
<b>G084</b>	Großhirn	52,51	54,66	53,08	<b>267,08</b>	0,9094
<b>G085</b>	Großhirn	11,04		7,34	<b>45,95</b>	1,8500
<b>G086</b>	Großhirn		7,13	7,66	<b>36,98</b>	0,2650

## Anhang

<b>G087</b>	Großhörn	20,78	16,82	21,38	<b>98,30</b>	2,0231
<b>G088</b>	Großhörn		5,16	5,13	<b>25,73</b>	0,0150
<b>G089</b>	Großhörn		23,63	23,25	<b>117,20</b>	0,1900
<b>G090</b>	Großhörn	201,42	166,71		<b>920,33</b>	17,3550
<b>G091</b>	Großhörn	43,38	54,44	54,58	<b>254,00</b>	5,2470
<b>G092</b>	Großhörn		119,46	95,43	<b>537,23</b>	12,0150
<b>G093</b>	Großhörn		71	79,92	<b>377,30</b>	4,4600
<b>G094</b>	Großhörn	109,6	100,04		<b>524,10</b>	4,7800
<b>G095</b>	Großhörn	28,61		31,31	<b>149,80</b>	1,3500
<b>G096</b>	Großhörn		35,91	30,74	<b>166,63</b>	2,5850
<b>G097</b>	Großhörn		30,86	33,41	<b>160,68</b>	1,2750
<b>G098</b>	Großhörn		35,88	25,97	<b>154,63</b>	4,9550
<b>G099</b>	Großhörn		37,1	36,92	<b>185,05</b>	0,0900
<b>G100</b>	Großhörn		35,36	30,44	<b>164,50</b>	2,4600

## Anhang

**Tabelle 24: Mittels RT-qPCR bestimmte Menge nukleärer DNA im Kleinhirngewebe (Mark).**  
Werte mit mehr als 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probennr.	Gewebe	Messung 1 (ng / 2 µl)	Messung 2 (ng / 2 µl)	Messung 3 (ng / 2 µl)	Mittelwert (ng / µl)	Standardabweichung (ng / µl)
G001	Kleinhirn	311,35	299,44	350,42	<b>160,20</b>	21,7748
G002	Kleinhirn	382,39	376,44	362,14	<b>186,83</b>	8,4981
G003	Kleinhirn	267,87	271,89	229,54	<b>128,22</b>	19,0871
G004	Kleinhirn	448,42	432,55		<b>220,24</b>	7,9350
G005	Kleinhirn	109,04	105,84	93,03	<b>513,18</b>	6,9174
G006	Kleinhirn	38,27	38,39	37,75	<b>190,68</b>	0,2778
G007	Kleinhirn	16,47	16,5	14,23	<b>78,67</b>	1,0631
G008	Kleinhirn	65,6	52,4		<b>295,00</b>	6,6000
G009	Kleinhirn	37,58	38,16	32,51	<b>180,42</b>	2,5378
G010	Kleinhirn	68,05	71,7	65,53	<b>342,13</b>	2,5329
G011	Kleinhirn	45,58	46,77	43,03	<b>225,63</b>	1,5601
G012	Kleinhirn	21,7	19,69	22,36	<b>106,25</b>	1,1355
G013	Kleinhirn	18,91	18,91		<b>94,55</b>	0,0000
G014	Kleinhirn	59,93	61,42	56,6	<b>296,58</b>	2,0150
G015	Kleinhirn	19,58		18,94	<b>96,30</b>	0,3200
G016	Kleinhirn	37,36		42,23	<b>198,98</b>	2,4350
G017	Kleinhirn		9,15	8,34	<b>43,73</b>	0,4050
G018	Kleinhirn	40,2		43,71	<b>209,78</b>	1,7550
G019	Kleinhirn	11,39	9,3		<b>51,73</b>	1,0450
G020	Kleinhirn	55,14	61,16	59,43	<b>292,88</b>	2,5306
G021	Kleinhirn		14,03	9,06	<b>57,73</b>	2,4850
G022	Kleinhirn	51,61	62	54,24	<b>279,75</b>	4,4107
G023	Kleinhirn	17,8	17,6	15,79	<b>85,32</b>	0,9041
G024	Kleinhirn	14,47	15,76	14,83	<b>75,10</b>	0,5435
G025	Kleinhirn	6,89	6,29		<b>32,95</b>	0,3000
G026	Kleinhirn	21,09	25,45	24,76	<b>118,83</b>	1,9135
G027	Kleinhirn		30,38	26,94	<b>143,30</b>	1,7200
G028	Kleinhirn	8,94	9,24	10,85	<b>48,38</b>	0,8387
G029	Kleinhirn		31,04	28,01	<b>147,63</b>	1,5150
G030	Kleinhirn	52,67	54,25	56,55	<b>272,45</b>	1,5931
G031	Kleinhirn	54,91	57,09		<b>280,00</b>	1,0900
G032	Kleinhirn	51,62	57,71	57,76	<b>278,48</b>	2,8827
G033	Kleinhirn	10,36	11,16	9,51	<b>51,72</b>	0,6737
G034	Kleinhirn	22,34	23,06	21,42	<b>111,37</b>	0,6712
G035	Kleinhirn		37,71	21,07	<b>146,95</b>	8,3200
G036	Kleinhirn	29,5	33,53	38,39	<b>169,03</b>	3,6346
G037	Kleinhirn		13,29	11,29	<b>61,45</b>	1,0000
G038	Kleinhirn	17,56	18,9	17,67	<b>90,22</b>	0,6074
G039	Kleinhirn	23,71	24,59		<b>120,75</b>	0,4400
G040	Kleinhirn	49,38	51,46	47,89	<b>247,88</b>	1,4641
G041	Kleinhirn		24,59	21,61	<b>115,50</b>	1,4900

## Anhang

<b>G042</b>	Kleinhirn	19,17	23,59	22,29	<b>108,42</b>	1,8547
<b>G043</b>	Kleinhirn	9,29	11,04		<b>50,83</b>	0,8750
<b>G044</b>	Kleinhirn	13,65	13,48	13,86	<b>68,32</b>	0,1554
<b>G045</b>	Kleinhirn	16,8	17,49	14,12	<b>80,68</b>	1,4536
<b>G046</b>	Kleinhirn	27,51	26,94	27,09	<b>135,90</b>	0,2412
<b>G047</b>	Kleinhirn	10,73	10,32	8,84	<b>49,82</b>	0,8118
<b>G048</b>	Kleinhirn		15,58	17,74	<b>83,30</b>	1,0800
<b>G049</b>	Kleinhirn		15,34	10,87	<b>65,53</b>	2,2350
<b>G050</b>	Kleinhirn	31,61	28,56	32,1	<b>153,78</b>	1,5661
<b>G051</b>	Kleinhirn		8,26	8,48	<b>41,85</b>	0,1100
<b>G052</b>	Kleinhirn		24,11	36,65	<b>151,90</b>	6,2700
<b>G053</b>	Kleinhirn	5,39	5,15	5,07	<b>26,02</b>	0,1360
<b>G054</b>	Kleinhirn	16,13	17,33	17,21	<b>84,45</b>	0,5396
<b>G055</b>	Kleinhirn	6,89	7,52		<b>36,03</b>	0,3150
<b>G056</b>	Kleinhirn		57,29	57,68	<b>287,43</b>	0,1950
<b>G057</b>	Kleinhirn		28,95	33,84	<b>156,98</b>	2,4450
<b>G058</b>	Kleinhirn		71,52	66,42	<b>344,85</b>	2,5500
<b>G059</b>	Kleinhirn	37,98	37,38		<b>188,40</b>	0,3000
<b>G060</b>	Kleinhirn		51,17	47,1	<b>245,68</b>	2,0350
<b>G061</b>	Kleinhirn	70,84	66,34		<b>342,95</b>	2,2500
<b>G062</b>	Kleinhirn	20,51	20,13	21,21	<b>103,08</b>	0,4473
<b>G063</b>	Kleinhirn	126,02	100,18		<b>565,50</b>	12,9200
<b>G064</b>	Kleinhirn		82,53	95,86	<b>445,98</b>	6,6650
<b>G065</b>	Kleinhirn	6,53	5,83	4,61	<b>28,28</b>	0,7934
<b>G066</b>	Kleinhirn	26,05	26,66	32,31	<b>141,70</b>	2,8182
<b>G067</b>	Kleinhirn	13,24	13,6	14,01	<b>68,08</b>	0,3146
<b>G068</b>	Kleinhirn		72,33	83,9	<b>390,58</b>	5,7850
<b>G069</b>	Kleinhirn	16,21		10,31	<b>66,30</b>	2,9500
<b>G070</b>	Kleinhirn		144,9	141,6	<b>716,25</b>	1,6500
<b>G071</b>	Kleinhirn		6,92	6,21	<b>32,83</b>	0,3550
<b>G072</b>	Kleinhirn	12,51	13,23		<b>64,35</b>	0,3600
<b>G073</b>	Kleinhirn	24,89	22,01		<b>117,25</b>	1,4400
<b>G074</b>	Kleinhirn	31,17	37,08		<b>170,63</b>	2,9550
<b>G075</b>	Kleinhirn	22,7	23,77		<b>116,18</b>	0,5350
<b>G076</b>	Kleinhirn	18,14	17,89	17,48	<b>89,18</b>	0,2721
<b>G077</b>	Kleinhirn	11,99	10,28	11,36	<b>56,05</b>	0,7061
<b>G078</b>	Kleinhirn	24,44	28,62	26,24	<b>132,17</b>	1,7119
<b>G079</b>	Kleinhirn	71,3	74,79	61,22	<b>345,52</b>	5,7536
<b>G080</b>	Kleinhirn	11,43	12,96		<b>60,98</b>	0,7650
<b>G081</b>	Kleinhirn		2,23	4,24	<b>16,18</b>	1,0050
<b>G082</b>	Kleinhirn	41,88	41,24		<b>207,80</b>	0,3200
<b>G083</b>	Kleinhirn	36,09	45,84	41,38	<b>205,52</b>	3,9852
<b>G084</b>	Kleinhirn	13,14	15,13	15,9	<b>73,62</b>	1,1629
<b>G085</b>	Kleinhirn	6,38	6,59	5,95	<b>31,53</b>	0,2664
<b>G086</b>	Kleinhirn	40,28	39,56	36,12	<b>193,27</b>	1,8153

## Anhang

<b>G087</b>	Kleinhirn	33,08	28,58	34,56	<b>160,37</b>	2,5430
<b>G088</b>	Kleinhirn	13,09		14,46	<b>68,88</b>	0,6850
<b>G089</b>	Kleinhirn	18,06	13,9		<b>79,90</b>	2,0800
<b>G090</b>	Kleinhirn	274,59	244,21		<b>1297,00</b>	15,1900
<b>G091</b>	Kleinhirn	102,65	93,99	88,48	<b>475,20</b>	5,8323
<b>G092</b>	Kleinhirn	59,51	51,43		<b>277,35</b>	4,0400
<b>G093</b>	Kleinhirn	70,66	78,22	84,03	<b>388,18</b>	5,4738
<b>G094</b>	Kleinhirn	34,07	38,89	44,03	<b>194,98</b>	4,0669
<b>G095</b>	Kleinhirn	25,25	31,48	28,8	<b>142,55</b>	2,5516
<b>G096</b>	Kleinhirn		9,15	6,64	<b>39,48</b>	1,2550
<b>G097</b>	Kleinhirn	54,88		59,98	<b>287,15</b>	2,5500
<b>G098</b>	Kleinhirn		20,72	17,84	<b>96,40</b>	1,4400
<b>G099</b>	Kleinhirn		28,97	29,18	<b>145,38</b>	0,1050
<b>G100</b>	Kleinhirn	13,92	13,09		<b>67,53</b>	0,4150

## Anhang

**Tabelle 25: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien Wildtyp mtDNA im Großhirngewebe (Rinde).** Werte (Rohdaten) mit mehr als 20% Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
G001	Großhirn	1570000	1500000	1900000	8283333,33	174419,67
G002	Großhirn	0	47984,3	54395,56	170633,1	3205,63
G003	Großhirn	1590000	1330000	1460000	7300000	106144,56
G004	Großhirn	1930000	1590000	0	5866666,67	170000,00
G005	Großhirn	0	1520000	1370000	4816666,67	75000,00
G006	Großhirn	0	835558,25	889231,19	2874649,07	26836,47
G007	Großhirn	0	1710000	1510000	5366666,67	100000,00
G008	Großhirn	0	447269,75	461038,31	1513846,77	6884,28
G009	Großhirn	12530,61	0	100562,02	188487,72	44015,71
G010	Großhirn	1690000	1690000	0	5633333,33	0,00
G011	Großhirn	237641,7	0	220573,08	763691,3	8534,31
G012	Großhirn	0	1740000	1720000	5766666,67	10000,00
G013	Großhirn	0	708,82	835,17	2573,3167	63,18
G014	Großhirn	8714,11	0	9519,93	30390,07	402,91
G015	Großhirn	550,8	0	644,75	1992,58	46,97
G016	Großhirn	0	183845,48	210526,77	657287,08	13340,64
G017	Großhirn	0	13,93	10,77	41,17	1,58
G018	Großhirn	208048,23	195402,31	0	672417,57	6322,96
G019	Großhirn	321,8	405,11	0	1211,5167	41,65
G020	Großhirn	0	14754,79	15006,94	49602,88	126,07
G021	Großhirn	0	6064,47	6717,36	21303,05	326,44
G022	Großhirn	974481,19	0	913184,63	3146109,7	30648,28
G023	Großhirn	822814,88	0	858110,25	2801541,88	17647,69
G024	Großhirn	0	19511,64	19424,04	64892,8	43,80
G025	Großhirn	127,56	0	116,61	406,95	5,47
G026	Großhirn	0	1556,48	2001,86	5930,57	222,69
G027	Großhirn	782,95	856,4	0	2732,25	36,73
G028	Großhirn	2170000	2300000	2310000	11300000	63770,42
G029	Großhirn	1430000	1370000	1370000	6950000	28284,27
G030	Großhirn	0	676456,25	616293,38	2154582,72	30081,44
G031	Großhirn	0	1730000	1670000	5666666,67	30000,00
G032	Großhirn	1540000	1750000	0	5483333,33	105000,00
G033	Großhirn	0	1248356,6	1046358,2	3824524,67	100999,20
G034	Großhirn	2680000	2570000	2510000	12933333,33	70395,71
G035	Großhirn	2770000	3090000	3360000	15366666,67	241154,63
G036	Großhirn	2490000	2110000	2580000	11966666,67	203688,21
G037	Großhirn	4720000	4180000	4010000	21516666,67	302691,63
G038	Großhirn	2210000	1800000	2000000	10016666,67	167398,39
G039	Großhirn	1370000	1500000	0	4783333,33	65000,00

## Anhang

<b>G040</b>	Großhirn	2370000	2360000	2820000	12583333,33	214527,91
<b>G041</b>	Großhirn	3630000	3530000	3580000	17900000	40824,83
<b>G042</b>	Großhirn	2590000	2820000	2420000	13050000	163910,54
<b>G043</b>	Großhirn	1070000	962797,5	0	3387995,83	53601,25
<b>G044</b>	Großhirn	0	2000000	2000000	6666666,67	0,00
<b>G045</b>	Großhirn	1020000	1250000	1330000	6000000	131402,69
<b>G046</b>	Großhirn	321684,31	304585,63	0	1043783,23	8549,34
<b>G047</b>	Großhirn	1970000	1910000	1830000	9516666,67	57348,84
<b>G048</b>	Großhirn	2130000	2290000	2890000	12183333,33	327142,51
<b>G049</b>	Großhirn	3950000	3670000	3530000	18583333,33	174610,68
<b>G050</b>	Großhirn	2500000	2400000	2380000	12133333,33	52493,39
<b>G051</b>	Großhirn	2100000	1900000	2000000	10000000	81649,66
<b>G052</b>	Großhirn	1740000	2150000	2460000	10583333,33	294882,27
<b>G053</b>	Großhirn	1250000	1150000	1440000	6400000	120277,46
<b>G054</b>	Großhirn	2910000	2660000	2910000	14133333,33	117851,13
<b>G055</b>	Großhirn	1990000	1840000	1960000	9650000	64807,41
<b>G056</b>	Großhirn	2110000	1870000	1650000	9383333,333	187853,37
<b>G057</b>	Großhirn	28935,97	29890,26	0	98043,71667	477,15
<b>G058</b>	Großhirn	3260000	2910000	2620 000	15425000	0,00
<b>G059</b>	Großhirn	1250000	1420000	1240000	32583333,33	82596,74
<b>G060</b>	Großhirn		763690,13	782869,81	19331999,25	9589,84
<b>G061</b>	Großhirn		1200000	1070000	28375000	65000,00
<b>G062</b>	Großhirn		1260000	1190000	30625000	35000,00
<b>G063</b>	Großhirn	1790000	1900000	1970000	47166666,67	74087,04
<b>G064</b>	Großhirn	1180000	977886,31	694668,94	23771293,75	199055,62
<b>G065</b>	Großhirn	768776,44	712899,13		18520944,63	27938,66
<b>G066</b>	Großhirn	97008,41	93334,75	88336,44	2322330	3554,06
<b>G067</b>	Großhirn	1270000	1310000	1370000	32916666,67	41096,09
<b>G068</b>	Großhirn	1790000	1620000	1530000	41166666,67	107806,41
<b>G069</b>	Großhirn		677443,63	594458,88	15898781,38	41492,38
<b>G070</b>	Großhirn	3670000	3820000		93625000	75000,00
<b>G071</b>	Großhirn	6180000	5870000	5600000	147083333,33	236971,63
<b>G072</b>	Großhirn	3360000	3190000	3030000	79833333,33	134742,55
<b>G073</b>	Großhirn	2860000	2700000	2600000	68000000	107082,52
<b>G074</b>	Großhirn		5410000	4940000	129375000	235000,00
<b>G075</b>	Großhirn	6830000	6150000		162250000	340000,00
<b>G076</b>	Großhirn	518064,28	550167,69		13352899,63	16051,71
<b>G077</b>	Großhirn	4420000	4150000	4340000	107583333,33	113235,25
<b>G078</b>	Großhirn	6140000		6380000	156500000	120000,00
<b>G079</b>	Großhirn	3790000		3650000	93000000	70000,00
<b>G080</b>	Großhirn	3360000	3100000	3040000	79166666,67	138884,44
<b>G081</b>	Großhirn	4800000	4670000	5330000	123333333,33	285462,59
<b>G082</b>	Großhirn		6410000	6970000	167250000	280000,00
<b>G083</b>	Großhirn	6600000	2900000	4320000	115166666,67	1524058,91
<b>G084</b>	Großhirn	3810000	3910000	4280000	100000000	202155,06

## Anhang

<b>G085</b>	Großhirn	2710000	2430000		64250000	140000,00
<b>G086</b>	Großhirn	2740000	2650000	2640000	66916666,67	44969,13
<b>G087</b>	Großhirn	1780000	1570000	1570000	41000000	98994,95
<b>G088</b>	Großhirn		2830000	2500000	66625000	165000,00
<b>G089</b>	Großhirn	198080,13	197608,05		4946102,25	236,04
<b>G090</b>	Großhirn	1710000	1830000	1910000	45416666,67	82192,19
<b>G091</b>	Großhirn		198116,42	189788,41	4848810,38	4164,00
<b>G092</b>	Großhirn	2320000	2410000	2330000	58833333,33	40276,82
<b>G093</b>	Großhirn		1490000	1450000	36750000	20000,00
<b>G094</b>	Großhirn	629807,63	577229,44	524193,72	14426923,25	43116,83
<b>G095</b>	Großhirn	4090000	3450000		94250000	320000,00
<b>G096</b>	Großhirn	2730000	2750000	2750000	68583333,33	9428,09
<b>G097</b>	Großhirn	2020000	2060000	1860000	49500000	86409,88
<b>G098</b>	Großhirn	1480000	1680000	1780000	41166666,67	124721,91
<b>G099</b>	Großhirn	5830000,00	4740000,00	5150000,00	131000000,00	449518,26
<b>G100</b>	Großhirn		6690000	6140000	160375000	275000,00

**Tabelle 26: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien Wildtyp mtDNA im Kleinhirngewebe (Rinde).** Werte (Rohdaten) mit mehr als 20% Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
<b>G001</b>	Kleinhirn	112128,25	116347,88	0	571190,33	2109,81
<b>G002</b>	Kleinhirn	0	57077,84	38736,39	239535,58	9170,72
<b>G003</b>	Kleinhirn	797119	782967,44	0	3950216,10	7075,78
<b>G004</b>	Kleinhirn	0	6950000	2990000	24850000,00	1980000,00
<b>G005</b>	Kleinhirn	838992,63	850340,88	0	4223333,78	5674,13
<b>G006</b>	Kleinhirn	1140000	1150000	1300000	5983333,33	73181,66
<b>G007</b>	Kleinhirn	0	1530000	1090000	6550000,00	220000,00
<b>G008</b>	Kleinhirn	0	4510000	3840000	20875000,00	335000,00
<b>G009</b>	Kleinhirn	0	1218,38	0	6091,90	0,00
<b>G010</b>	Kleinhirn	724,96	598,08	0	3307,60	63,44
<b>G011</b>	Kleinhirn	0	0	0	0,00	0,00
<b>G012</b>	Kleinhirn	0	354,66	308,88	1658,85	22,89
<b>G013</b>	Kleinhirn	2629,51	2193,09	2419,83	12070,72	178,21
<b>G014</b>	Kleinhirn	0	133055,66	134555,41	669027,68	749,88
<b>G015</b>	Kleinhirn	494132,94	0	473914,28	2420118,05	10109,33
<b>G016</b>	Kleinhirn	0	1560000	1540000	7750000,00	10000,00
<b>G017</b>	Kleinhirn	2660,72	2528,56	2703,98	13155,43	74,62
<b>G018</b>	Kleinhirn	1010,64	955,56	1028,64	4991,40	31,09
<b>G019</b>	Kleinhirn	9779,7	9420,28	0	47999,95	179,71
<b>G020</b>	Kleinhirn	168461,69	0	153325,72	804468,53	7567,98

## Anhang

<b>G021</b>	Kleinhirn	0	35762,75	32400,48	170408,08	1681,14
<b>G022</b>	Kleinhirn	0	53302,59	57512,41	277037,50	2104,91
<b>G023</b>	Kleinhirn	0	84716,04	86943,8	429149,60	1113,88
<b>G024</b>	Kleinhirn	0	57485,96	55310,26	281990,55	1087,85
<b>G025</b>	Kleinhirn	0	32977,43	32170,08	162868,78	403,68
<b>G026</b>	Kleinhirn	307259,22	298827,38	0	1515216,50	4215,92
<b>G027</b>	Kleinhirn	19754,31	18437,3	19250,04	95736,08	542,56
<b>G028</b>	Kleinhirn	40296,05	43029,48	46199,05	215874,30	2412,08
<b>G029</b>	Kleinhirn	891402,44	910813,5	0	4505539,85	9705,53
<b>G030</b>	Kleinhirn	0	46072,64	46999,96	232681,50	463,66
<b>G031</b>	Kleinhirn	182229,64	0	177835,17	900162,03	2197,23
<b>G032</b>	Kleinhirn	1150000	1260000	1340000	6250000,00	77888,81
<b>G033</b>	Kleinhirn	5339,93	0	13318,21	46645,35	3989,14
<b>G034</b>	Kleinhirn	1310000	1270000	1070000	6083333,33	104986,77
<b>G035</b>	Kleinhirn	0	1090000	1360000	6125000,00	135000,00
<b>G036</b>	Kleinhirn	228675,61	233777,08	0	1156131,73	2550,74
<b>G037</b>	Kleinhirn	1260000	1010000	0	5675000,00	125000,00
<b>G038</b>	Kleinhirn	758407,19	857728,63	658071,56	3790345,63	81510,01
<b>G039</b>	Kleinhirn	622220,38	543782,75	703631,75	3116058,13	65261,85
<b>G040</b>	Kleinhirn	1210000	1090000	1240000	5900000,00	64807,41
<b>G041</b>	Kleinhirn	786638,88	784365,56	810293,56	3968830,00	11723,54
<b>G042</b>	Kleinhirn	1130000	0	981830,94	5279577,35	74084,53
<b>G043</b>	Kleinhirn	723947,44	718591,75	695860,5	3563999,48	12175,88
<b>G044</b>	Kleinhirn	804052,81	763899,69	0	3919881,25	20076,56
<b>G045</b>	Kleinhirn	783813	881387,44	942842,31	4346737,92	65479,25
<b>G046</b>	Kleinhirn	0	64192,98	58393,19	306465,43	2899,89
<b>G047</b>	Kleinhirn	714395,25	668873,25	0	3458171,25	22761,00
<b>G048</b>	Kleinhirn	646387,25	733785,19	0	3450431,10	43698,97
<b>G049</b>	Kleinhirn	1330000	0	1370000	6750000,00	20000,00
<b>G050</b>	Kleinhirn	0	1050000	1030000	5200000,00	10000,00
<b>G051</b>	Kleinhirn	0	1130000	1030000	5400000,00	50000,00
<b>G052</b>	Kleinhirn	525748,13	596137,88	0	2804715,03	35194,88
<b>G053</b>	Kleinhirn	202344,84	213182,81	254800,33	1117213,30	22610,37
<b>G054</b>	Kleinhirn	0	583358,06	612076,06	2988585,30	14359,00
<b>G055</b>	Kleinhirn	327907,03	315980,88	265489,53	1515629,07	27054,58
<b>G056</b>	Kleinhirn	235182,44	240736,14	239771,08	1192816,10	2422,82
<b>G057</b>	Kleinhirn	987,32	2257,75	0	8112,68	635,22
<b>G058</b>	Kleinhirn	654792,38	566390,38	673440,38	3157705,23	46693,28
<b>G059</b>	Kleinhirn	207991,44	208677,20	224814,50	5345692,83	7773,87
<b>G060</b>	Kleinhirn	288822,72	298027,31	368101,22	7957927,08	35402,70
<b>G061</b>	Kleinhirn		2170000	2260000	55375000,00	45000,00
<b>G062</b>	Kleinhirn	328218,88	260856,88		7363447,00	33681,00
<b>G063</b>	Kleinhirn		2170000	2360000	56625000,00	95000,00
<b>G064</b>	Kleinhirn	745865,31		716473,63	18279236,75	14695,84
<b>G065</b>	Kleinhirn	295437,69	290288,91		7321582,50	2574,39

## Anhang

<b>G066</b>	Kleinhirn	24882,52	20095,24		562222,00	2393,64
<b>G067</b>	Kleinhirn	348541,47	418325,44	446456,91	10111031,83	41161,76
<b>G068</b>	Kleinhirn	2030000	2000000	1950000	49833333,33	32998,32
<b>G069</b>	Kleinhirn	182009,61	183364,61		4567177,75	677,50
<b>G070</b>	Kleinhirn	3140000	2990000	2930000	75500000,00	88317,61
<b>G071</b>	Kleinhirn		566988,13	500387,38	13342193,88	33300,38
<b>G072</b>	Kleinhirn	980345,25	1180000	964668,56	26041781,75	98022,34
<b>G073</b>	Kleinhirn	847550,13	754065,13	661629,00	18860368,83	75902,39
<b>G074</b>	Kleinhirn	1290000	1420000	1420000	34416666,67	61282,59
<b>G075</b>	Kleinhirn	711614,75	721454,00		17913359,38	4919,63
<b>G076</b>	Kleinhirn		250643,86	200844,92	5643609,75	24899,47
<b>G077</b>	Kleinhirn	380506,59	349471,38		9124724,63	15517,61
<b>G078</b>	Kleinhirn	2650000		2810000	68250000,00	80000,00
<b>G079</b>	Kleinhirn		202488,95	172405,75	4686183,75	15041,60
<b>G080</b>	Kleinhirn		1440000	1590000	37875000,00	75000,00
<b>G081</b>	Kleinhirn	1430000,00	836434,81	416143,94	22354822,92	415915,08
<b>G082</b>	Kleinhirn	869492,13	2600000	1230000	39162434,42	745469,53
<b>G083</b>	Kleinhirn	789569,88	733058,25		19032851,63	28255,82
<b>G084</b>	Kleinhirn	505064,94	468293,16	461256,41	11955120,92	19208,99
<b>G085</b>	Kleinhirn	702820,44	514592,13	366590,13	13200022,50	137592,52
<b>G086</b>	Kleinhirn	389488,72		349022,25	9231387,13	20233,23
<b>G087</b>	Kleinhirn		325901,19	272118,84	7475250,38	26891,18
<b>G088</b>	Kleinhirn	925432,50	1020000	995356,75	24506577,08	40055,10
<b>G089</b>	Kleinhirn	88621,21	82315,73	80683,38	2096836,00	3422,68
<b>G090</b>	Kleinhirn	981997,88	904556,19	895807,88	23186349,58	38733,37
<b>G091</b>	Kleinhirn	25002,37	27680,89		658540,75	1339,26
<b>G092</b>	Kleinhirn	1760000	1850000	1590000	43333333,33	130000,00
<b>G093</b>	Kleinhirn	1730000	1490000	1450000	38916666,67	20000,00
<b>G094</b>	Kleinhirn	161772,72	175542,14	163652,06	4174724,33	6096,47
<b>G095</b>	Kleinhirn	368491,03	342194,06		8883563,63	13148,48
<b>G096</b>	Kleinhirn	163220,86	169891,13	158136,64	4093738,58	4813,29
<b>G097</b>	Kleinhirn		251031,33	203511,98	5681791,38	23759,67
<b>G098</b>	Kleinhirn	1480000	1680000	1780000	41166666,67	124721,91
<b>G099</b>	Kleinhirn	787910,88	720340,50	732232,44	18670698,50	29452,91
<b>G100</b>	Kleinhirn		1280000	1020000	28750000,00	130000,00

## Anhang

**Tabelle 27: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien Wildtyp mtDNA im Großhirngewebe (Mark).** Werte (Rohdaten) mit mehr als 20% Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
G001	Großhirn	289056,25	381363,03	363047,88	8612226,33	39903,70
G002	Großhirn	164801,33		105700,70	3381275,38	29550,32
G003	Großhirn	675381,44	696973,00	659531,63	16932383,92	15345,17
G004	Großhirn	267076,66	211567,30		5983049,50	27754,68
G005	Großhirn	1140000,00	1010000,00	1100000,00	27083333,33	54365,02
G006	Großhirn	408938,72	374471,81	370267,31	9613982,00	17324,11
G007	Großhirn		243338,20	303896,88	6840438,50	30279,34
G008	Großhirn	334236,56		286920,66	7764465,25	23657,95
G009	Großhirn	39636,67	44656,91		1053669,75	2510,12
G010	Großhirn	756776,88	819126,94	920429,19	20802775,08	50651,13
G011	Großhirn	9760000,00	9470000,00	8410000,00	4606666,67	580248,99
G012	Großhirn	225780,81	197565,84		5291833,13	14107,48
G013	Großhirn	3140000,00	3170000,00	3040000,00	77916666,67	55577,77
G014	Großhirn	3190000,00	2870000,00	3310000,00	78083333,33	185711,84
G015	Großhirn		1260000,00	1170000,00	30375000,00	45000,00
G016	Großhirn		657184,75	495062,91	14403095,75	81060,92
G017	Großhirn	343806,78	266009,34	319624,63	7745339,58	32509,52
G018	Großhirn	965078,00	975443,00		24256512,50	5182,50
G019	Großhirn	135479,67	134683,75	152220,08	3098135,83	8085,64
G020	Großhirn	343456,56	297302,38	301663,97	9702605,00	20805,59
G021	Großhirn	304929,66	279353,09		1407945,00	12788,29
G022	Großhirn	273339,84	186444,25		3141409,70	43447,80
G023	Großhirn	46379,93	39468,29	39045,73	2921413,75	3362,21
G024	Großhirn	398415,53	443383,53	401832,59	2298920,45	20440,37
G025	Großhirn	417648,03	375331,41	391956,47	416313,17	17407,36
G026	Großhirn	229113,41	190158,91		4145438,83	19477,25
G027	Großhirn		179940,77	157851,78	3949786,37	11044,50
G028	Großhirn	243885,19	260805,25	261887,22	2096361,60	8243,06
G029	Großhirn	645303,19	627160,69		1688962,75	9071,25
G030	Großhirn	216847,25	232480,47		2555258,87	7816,61
G031	Großhirn	768326,63	688367,50	645713,50	6362319,40	50823,01
G032	Großhirn	433426,28	354965,03	400477,31	2246638,60	32168,26
G033	Großhirn		13696,81	13028,95	7008025,43	333,93
G034	Großhirn		222957,48	184807,98	3962895,40	19074,75
G035	Großhirn	471795,56	460381,78	503874,31	133628,80	18411,71
G036	Großhirn	941858,19	851670,81	1020000,00	2038827,30	68778,73
G037	Großhirn	228548,34	176808,77		5066963,88	25869,78
G038	Großhirn	180063,77	159598,86	168560,13	4235189,67	8376,23
G039	Großhirn		131191,22	136889,75	3351012,13	2849,27
G040	Großhirn		112954,20	95586,91	2606763,88	8683,64

## Anhang

<b>G041</b>	Großhirn	414331,91	408193,75	432129,34	10455458,33	10150,74
<b>G042</b>	Großhirn	88675,34	100099,52	86630,98	2295048,67	5926,33
<b>G043</b>	Großhirn	110942,52	109518,02	102075,13	2687797,25	3888,11
<b>G044</b>	Großhirn	115136,38	111222,31		2829483,63	1957,04
<b>G045</b>	Großhirn		43998,51	42205,69	1077552,50	896,41
<b>G046</b>	Großhirn	9113,36	8516,21		220369,63	298,58
<b>G047</b>	Großhirn	421571,44	371732,16		9916295,00	24919,64
<b>G048</b>	Großhirn	26771,35	25386,10	24609,67	639726,00	894,09
<b>G049</b>	Großhirn	38587,75	35262,10	33864,80	897622,08	1980,98
<b>G050</b>	Großhirn	61192,98	54813,30	66206,08	1518436,33	4662,22
<b>G051</b>	Großhirn	31473,89	30144,59		770231,00	664,65
<b>G052</b>	Großhirn	34095,31	34388,77	33584,29	850569,75	332,41
<b>G053</b>	Großhirn	160533,47	123449,88	143034,36	3558480,92	15147,29
<b>G054</b>	Großhirn	68668,22	51004,21		1495905,38	8832,01
<b>G055</b>	Großhirn	125958,61	128413,84	126487,47	3173832,67	1055,08
<b>G056</b>	Großhirn	652364,25	697214,56	612659,00	16351981,75	34540,96
<b>G057</b>	Großhirn		10913,54	11484,12	279970,75	285,29
<b>G058</b>	Großhirn	115927,54	100880,52		2710100,75	7523,51
<b>G059</b>	Großhirn	224316,88	192852,56		5214618,00	15732,16
<b>G060</b>	Großhirn	74450,52		81925,64	1954702,00	3737,56
<b>G061</b>	Großhirn	139170,48	129429,44		3357499,00	4870,52
<b>G062</b>	Großhirn	153005,48	134769,52		3597187,50	9117,98
<b>G063</b>	Großhirn		125109,08	129214,91	3179049,88	2052,92
<b>G064</b>	Großhirn	143757,94	131239,00		3437461,75	6259,47
<b>G065</b>	Großhirn	325573,91	283974,53	313887,09	7695296,08	17517,77
<b>G066</b>	Großhirn	13663,31		15845,95	368865,75	1091,32
<b>G067</b>	Großhirn		64889,39	50502,84	1442402,88	7193,27
<b>G068</b>	Großhirn	337676,28	299310,97	360542,38	8312746,92	25263,15
<b>G069</b>	Großhirn		250612,98	222414,50	5912843,50	14099,24
<b>G070</b>	Großhirn		147017,27	161988,59	3862573,25	7485,66
<b>G071</b>	Großhirn		109150,41	91831,16	2512269,63	8659,63
<b>G072</b>	Großhirn	543209,81	463496,38	471630,72	12319474,25	35814,28
<b>G073</b>	Großhirn		301145,09	318158,59	7741296,00	8506,75
<b>G074</b>	Großhirn	183698,84	195111,19		4735125,38	5706,17
<b>G075</b>	Großhirn	151148,00	148979,89		3751598,63	1084,06
<b>G076</b>	Großhirn	309391,63	279354,16	283460,34	7268384,42	13298,05
<b>G077</b>	Großhirn	212789,63	209216,67	196441,17	5153728,92	7017,85
<b>G078</b>	Großhirn	347330,03	338486,97	395109,84	9007723,67	24871,36
<b>G079</b>	Großhirn	286350,06	264361,19	257112,52	6731864,75	12431,53
<b>G080</b>	Großhirn	543120,94	434617,31	480243,56	12149848,42	44482,65
<b>G081</b>	Großhirn	260283,22	270480,88		6634551,25	5098,83
<b>G082</b>	Großhirn	362251,44	321200,28		8543146,50	20525,58
<b>G083</b>	Großhirn	257202,95	240619,00		6222774,38	8291,98
<b>G084</b>	Großhirn	579597,88	496354,59	503182,53	13159458,33	37735,00
<b>G085</b>	Großhirn	316456,75	263201,47		7245727,75	26627,64

## Anhang

<b>G086</b>	Großhirn	108354,62	115096,12		2793134,25	3370,75
<b>G087</b>	Großhirn		1160000,00	1230000,00	29875000,00	35000,00
<b>G088</b>	Großhirn		510309,16	518223,50	12856658,25	3957,17
<b>G089</b>	Großhirn	115525,66		109037,50	2807039,50	3244,08
<b>G090</b>	Großhirn	687597,38	612280,50	615273,00	15959590,67	34820,82
<b>G091</b>	Großhirn		25166,86	21095,93	578284,88	2035,47
<b>G092</b>	Großhirn	506885,97	484488,84		12392185,13	11198,56
<b>G093</b>	Großhirn		278209,56	280366,16	6982196,50	1078,30
<b>G094</b>	Großhirn	42818,73	42697,07	36639,06	1017957,17	2884,88
<b>G095</b>	Großhirn	370784,06	368825,00	410111,56	12177568,17	19017,74
<b>G096</b>	Großhirn	245771,89	213995,69	192988,11	5439630,75	21697,86
<b>G097</b>	Großhirn	560962,00	554894,19	520213,66	13633915,42	17950,50
<b>G098</b>	Großhirn	619434,63	576008,38	545650,63	14509113,67	30279,28
<b>G099</b>	Großhirn		532527,88	524947,94	13218447,75	3789,97
<b>G100</b>	Großhirn	604526,00	540623,44		14314368,00	31951,28

## Anhang

**Tabelle 28: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien Wildtyp mtDNA im Kleinhirngewebe (Mark).** Werte (Rohdaten) mit mehr als 20% Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
G001	Kleinhirn	783940,44	725447,13	897518,44	8023020,03	71437,59
G002	Kleinhirn	124144,45	118820,77	121275,44	1214135,53	2175,58
G003	Kleinhirn	1030000,00	940326,06	993379,81	9879019,57	36813,58
G004	Kleinhirn		854504,31	691136,75	7728205,30	81683,78
G005	Kleinhirn	1300000,00	1160000,00	1220000,00	12266666,67	57348,84
G006	Kleinhirn	990682,31		1080000,00	10353411,55	44658,84
G007	Kleinhirn	655020,75	699292,13	733004,88	6957725,87	31934,01
G008	Kleinhirn		1160000,00	978090,50	10690452,50	90954,75
G009	Kleinhirn		159748,66	133089,64	1464191,50	13329,51
G010	Kleinhirn	1810000,00	1980000,00	2220000,00	20033333,33	168193,01
G011	Kleinhirn	165829,05		132485,94	1491574,95	16671,56
G012	Kleinhirn	394782,25	374105,59	317368,88	3620855,73	32726,83
G013	Kleinhirn	1020000,00	954748,31	939979,06	9715757,90	34767,90
G014	Kleinhirn	973163,19	962018,13	905981,69	9470543,37	29396,99
G015	Kleinhirn		680654,81	623473,75	6520642,80	28590,53
G016	Kleinhirn		782991,00	676461,81	7297264,05	53264,60
G017	Kleinhirn	79623,00	66908,39	86490,14	776738,43	8112,16
G018	Kleinhirn	1020000,00	840486,56	1100000,00	9868288,53	108511,29
G019	Kleinhirn		580846,50	589883,81	5853651,55	4518,66
G020	Kleinhirn	1130000,00	1070000,00		11000000,00	30000,00
G021	Kleinhirn	641233,13	824815,81	794322,88	7534572,73	80324,96
G022	Kleinhirn	1150000,00	1260000,00	1250000,00	12200000,00	49665,55
G023	Kleinhirn	1230000,00	1270000,00	1060000,00	11866666,67	91043,34
G024	Kleinhirn	798963,56	678678,38		7388209,70	60142,59
G025	Kleinhirn		438190,53	468383,81	4532871,70	15096,64
G026	Kleinhirn	1060000,00	1090000,00	1270000,00	11400000,00	92736,18
G027	Kleinhirn	1460000,00	1220000,00	1160000,00	12800000,00	129614,81
G028	Kleinhirn	211248,44	191245,44	188921,63	1971385,03	10022,23
G029	Kleinhirn	514419,75	449616,75		4820182,50	32401,50
G030	Kleinhirn		1010000,00	913485,75	9617428,75	48257,13
G031	Kleinhirn	1360000,00	1200000,00	1220000,00	12600000,00	71180,52
G032	Kleinhirn	682139,56	644958,88	538876,69	6219917,10	60699,70
G033	Kleinhirn	13919,41	8121,61		110205,10	2898,90
G034	Kleinhirn		1060000,00	1080000,00	10700000,00	10000,00
G035	Kleinhirn	2150000,00	2050000,00	2130000,00	21100000,00	43204,94
G036	Kleinhirn		1700000,00	1510000,00	16050000,00	95000,00
G037	Kleinhirn	224550,84	207036,64	180865,06	5103771,17	17951,00
G038	Kleinhirn		124090,48	108542,61	2907913,63	7773,94
G039	Kleinhirn	244097,83	226583,45	245001,22	5964020,83	8477,32
G040	Kleinhirn	416926,97	402337,22	438178,72	10478690,92	14716,25

## Anhang

<b>G041</b>	Kleinhirn		231808,98	239089,72	5886233,75	3640,37
<b>G042</b>	Kleinhirn	143579,11	120799,20		3304728,88	11389,95
<b>G043</b>	Kleinhirn	116966,14	133984,64	143179,13	3284415,92	10859,14
<b>G044</b>	Kleinhirn	150740,45		137136,13	3598457,25	6802,16
<b>G045</b>	Kleinhirn	173170,75	177711,14	153441,47	4202694,67	10535,00
<b>G046</b>	Kleinhirn	31005,87		28656,46	745779,13	1174,70
<b>G047</b>	Kleinhirn		70400,98	82077,60	1905982,25	5838,31
<b>G048</b>	Kleinhirn	107781,98	113296,36	110530,03	2763403,08	2251,24
<b>G049</b>	Kleinhirn		115875,73	105846,00	2771521,63	5014,87
<b>G050</b>	Kleinhirn	170355,66	177391,73	158749,58	4220808,08	7686,48
<b>G051</b>	Kleinhirn		97220,52	91209,29	2355372,63	3005,61
<b>G052</b>	Kleinhirn	78478,11	74319,30	77507,90	1919210,92	1776,52
<b>G053</b>	Kleinhirn		52939,71	66516,60	1493203,88	6788,45
<b>G054</b>	Kleinhirn	124334,02	110363,54		2933719,50	6985,24
<b>G055</b>	Kleinhirn	108834,38		94545,19	2542244,63	7144,60
<b>G056</b>	Kleinhirn	174760,09	147969,47		4034119,50	13395,31
<b>G057</b>	Kleinhirn	36005,80		40497,69	956293,63	2245,94
<b>G058</b>	Kleinhirn	674197,75	621663,06	625115,63	16008137,00	23992,75
<b>G059</b>	Kleinhirn		351078,91	305426,41	8206316,50	22826,25
<b>G060</b>	Kleinhirn	265000,47	252648,69		6470614,50	6175,89
<b>G061</b>	Kleinhirn		318308,50	332991,72	8141252,75	7341,61
<b>G062</b>	Kleinhirn	184979,64	184326,50	179674,78	4574841,00	2361,89
<b>G063</b>	Kleinhirn	625523,75	618319,25		15548037,50	3602,25
<b>G064</b>	Kleinhirn	525575,50	491927,41	492900,78	12586697,42	15637,49
<b>G065</b>	Kleinhirn		76062,78	67424,34	1793589,00	4319,22
<b>G066</b>	Kleinhirn	43761,14		36363,02	1001552,00	3699,06
<b>G067</b>	Kleinhirn	235246,19	202803,78	342703,53	6506279,17	59788,08
<b>G068</b>	Kleinhirn		215533,11	211398,98	5336651,13	2067,07
<b>G069</b>	Kleinhirn		126119,39	101585,38	2846309,63	12267,00
<b>G070</b>	Kleinhirn		386908,34	373236,66	9501812,50	6835,84
<b>G071</b>	Kleinhirn	186495,97		198129,80	4807822,13	5816,91
<b>G072</b>	Kleinhirn	102706,67	102204,80	112059,17	2641422,00	4531,74
<b>G073</b>	Kleinhirn	120515,52	107250,55	99568,91	2727791,50	8652,09
<b>G074</b>	Kleinhirn		191492,06	203262,42	4934431,00	5885,18
<b>G075</b>	Kleinhirn	195001,28	203069,61	226824,30	5207459,92	13507,56
<b>G076</b>	Kleinhirn	144502,09		121715,59	3327721,00	11393,25
<b>G077</b>	Kleinhirn		79541,02	79041,55	1982282,13	249,73
<b>G078</b>	Kleinhirn		69642,48	48456,05	1476231,63	10593,22
<b>G079</b>	Kleinhirn	206198,44	203748,47	207342,83	5144081,17	1499,31
<b>G080</b>	Kleinhirn		383689,97	368256,34	9399328,88	7716,81
<b>G081</b>	Kleinhirn	328654,00	311909,78		8007047,25	8372,11
<b>G082</b>	Kleinhirn		390496,56	413506,38	10050036,75	11504,91
<b>G083</b>	Kleinhirn		479602,13	400157,19	10996991,50	39722,47
<b>G084</b>	Kleinhirn	771835,63	753642,81		19068480,50	9096,41
<b>G085</b>	Kleinhirn	402444,06	335833,50	418745,84	9641861,67	35865,75

## Anhang

<b>G086</b>	Kleinhirn		335550,25	280642,06	7702403,88	27454,09
<b>G087</b>	Kleinhirn	1060000,00	1090000,00		26875000,00	15000,00
<b>G088</b>	Kleinhirn		1060000,00	1130000,00	27375000,00	35000,00
<b>G089</b>	Kleinhirn		78454,81	53365,68	1647756,13	12544,57
<b>G090</b>	Kleinhirn	1250000,00	1050000,00		28750000,00	100000,00
<b>G091</b>	Kleinhirn		97160,26	88291,98	2318153,00	4434,14
<b>G092</b>	Kleinhirn	550331,63	435854,44		12327325,88	57238,59
<b>G093</b>	Kleinhirn	423740,47	375952,03	378126,91	9815161,75	22032,96
<b>G094</b>	Kleinhirn	54621,13		48933,18	1294428,88	2843,97
<b>G095</b>	Kleinhirn	540712,81	457431,06	463164,31	12177568,17	37980,24
<b>G096</b>	Kleinhirn	254825,75	201962,64		5709854,88	26431,56
<b>G097</b>	Kleinhirn	733694,44	794308,69	645921,38	18116037,58	60916,15
<b>G098</b>	Kleinhirn	494380,25	397923,25		11153793,75	48228,50
<b>G099</b>	Kleinhirn	269837,84	292681,03	276163,13	6989016,67	9630,17
<b>G100</b>	Kleinhirn	215217,78	221340,86	189330,44	5215742,33	13873,69

## Anhang

**Tabelle 29: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien mtDNA mit 4977 bp Deletion im Großhirngewebe (Rinde).** Werte (Rohdaten) mit über 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
G001	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G002	Großhirn	0,00	349,86	397,02	1867,20	23,58
G003	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G004	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G005	Großhirn	0,00	372,08	307,18	1698,15	32,45
G006	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G007	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G008	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G009	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G010	Großhirn	3523,60	4483,89	0,00	20018,73	480,15
G011	Großhirn	26,74	86,45	0,00	282,98	29,86
G012	Großhirn	0,00	250,97	658,07	2272,60	203,55
G013	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G014	Großhirn	0,00	3,61	0,00	18,05	0,00
G015	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G016	Großhirn	15,73	0,00	0,00	78,65	0,00
G017	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G018	Großhirn	337,13	286,67	0,00	1559,50	25,23
G019	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G020	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G021	Großhirn	1,12	0,00	0,00	5,60	0,00
G022	Großhirn	0,00	1851,82	2100,54	9880,90	124,36
G023	Großhirn	779,39	764,24	0,00	3859,08	7,57
G024	Großhirn	0,00	59,70	68,29	319,98	4,29
G025	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G026	Großhirn	0,00	0,00	8,20	20,50	0,00
G027	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G028	Großhirn	39,94	32,80	31,45	173,65	3,73
G029	Großhirn	295,94	291,14	0,00	1467,70	138,39
G030	Großhirn	0,00	14,89	18,34	83,08	1,72
G031	Großhirn	0,00	3511,41	3874,48	18464,73	181,54
G032	Großhirn	0,00	704,66	816,31	3802,43	55,83
G033	Großhirn	0,00	7175,60	6636,26	34529,65	269,67
G034	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G035	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G036	Großhirn	0,00	3496,49	3881,69	18445,45	192,60
G037	Großhirn	0,00	1900,99	1229,44	7826,08	335,77
G038	Großhirn	0,00	96,69	103,11	499,50	3,21
G039	Großhirn	0,00	1331,65	675,53	5017,95	328,06
G040	Großhirn	1536,46	1427,13	0,00	7408,98	54,67
G041	Großhirn	0,00	4968,63	5032,68	25003,28	32,02

## Anhang

<b>G042</b>	Großhirn	2223,49	2387,45	0,00	11527,35	81,98
<b>G043</b>	Großhirn	462,57	326,46	0,00	1972,58	68,06
<b>G044</b>	Großhirn	1341,75	1217,20	1131,04	6149,98	86,50
<b>G045</b>	Großhirn	0,00	589,58	594,86	2961,10	2,64
<b>G046</b>	Großhirn	2070,28	1557,19	1051,98	7799,08	415,72
<b>G047</b>	Großhirn	9,80			49,00	0,00
<b>G048</b>	Großhirn	590,41	566,26	0,00	2891,68	12,07
<b>G049</b>	Großhirn	2527,95	2441,60	2763,57	12888,53	136,07
<b>G050</b>	Großhirn	2406,55	2204,08	2217,17	11379,67	92,51
<b>G051</b>	Großhirn	747,02	0,00	702,62	3624,10	22,20
<b>G052</b>	Großhirn	46,39	218,74	215,86	801,65	80,58
<b>G053</b>	Großhirn	0,00	325,33	222,21	1368,85	51,56
<b>G054</b>	Großhirn	25,68	0,00	0,00	128,40	0,00
<b>G055</b>	Großhirn	3623,20	0,00	2687,68	15777,20	467,76
<b>G056</b>	Großhirn	0,00	121,95		609,75	0,00
<b>G057</b>	Großhirn	55,28	0,00	40,85	240,33	7,22
<b>G058</b>	Großhirn	3020,23	2908,41	0,00	14821,60	55,91
<b>G059</b>	Großhirn	2655,41	2967,53	2712,42	69461,33	135,71
<b>G060</b>	Großhirn	5160,77	5316,35		130964,00	77,79
<b>G061</b>	Großhirn	5677,47	4755,65		130414,00	460,91
<b>G062</b>	Großhirn	3429,68	3851,89		91019,63	211,10
<b>G063</b>	Großhirn		9661,68	11057,57	258990,63	697,94
<b>G064</b>	Großhirn	2415,57	3010,74		67828,88	297,59
<b>G065</b>	Großhirn	383,45	445,64		10363,63	31,10
<b>G066</b>	Großhirn	789,37		770,28	19495,63	9,54
<b>G067</b>	Großhirn	2561,93	2656,21	2730,67	66240,08	69,05
<b>G068</b>	Großhirn		8303,97	7798,90	201285,88	252,53
<b>G069</b>	Großhirn	2756,40	2064,46		60260,75	345,97
<b>G070</b>	Großhirn	7822,05	7691,63		193921,00	65,21
<b>G071</b>	Großhirn		3243,54	3048,92	78655,75	97,31
<b>G072</b>	Großhirn	3960,05	3892,34		98154,88	33,86
<b>G073</b>	Großhirn	514,49	454,40	442,30	11759,92	31,57
<b>G074</b>	Großhirn	13194,03	13131,02	10646,36	308095,08	1186,41
<b>G075</b>	Großhirn	2760,65	2168,90		61619,38	295,88
<b>G076</b>	Großhirn	2717,73	2580,06	2431,63	64411,83	116,83
<b>G077</b>	Großhirn		551,64	588,87	14256,38	18,62
<b>G078</b>	Großhirn	6419,72	5618,53	6613,53	155431,50	430,70
<b>G079</b>	Großhirn		3588,18	2909,16	81216,75	339,51
<b>G080</b>	Großhirn		2135,52	2178,77	53928,63	21,63
<b>G081</b>	Großhirn	556,85	692,47		15616,50	67,81
<b>G082</b>	Großhirn		904,31		22607,75	0,00
<b>G083</b>	Großhirn		3606,05	2839,32	80567,13	383,36
<b>G084</b>	Großhirn	14523,33	13755,04		353479,63	384,14
<b>G085</b>	Großhirn	5967,73	4807,43		134689,50	580,15
<b>G086</b>	Großhirn	4725,40	5102,75	6059,02	132393,08	561,29

## Anhang

<b>G087</b>	Großhirn	4342,84	4238,67	5121,62	114192,75	393,98
<b>G088</b>	Großhirn	2121,80	3201,13		66536,63	539,67
<b>G089</b>	Großhirn	5550,05		4494,86	125561,38	527,60
<b>G090</b>	Großhirn	2269,24	2020,67	2705,29	58293,33	282,97
<b>G091</b>	Großhirn		1486,81	1481,19	37100,00	2,81
<b>G092</b>	Großhirn	6436,99	6489,38	7921,76	173734,42	687,91
<b>G093</b>	Großhirn	1368,90	1280,89	1331,08	33173,92	36,05
<b>G094</b>	Großhirn	6704,11	6528,20		165403,88	87,95
<b>G095</b>	Großhirn	7100,21	6700,74		172511,88	199,73
<b>G096</b>	Großhirn	14384,98	13067,75		343159,13	658,62
<b>G097</b>	Großhirn	1523,01	1272,88		34948,63	125,06
<b>G098</b>	Großhirn	22,88		18,77	520,63	2,06
<b>G099</b>	Großhirn	13230,18		12093,39	316544,63	568,40
<b>G100</b>	Großhirn		15371,09	14956,42	379093,88	207,33

## Anhang

**Tabelle 30: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien mtDNA mit 4977 bp Deletion im Kleinhirngewebe (Rinde).** Werte (Rohdaten) mit über 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
G001	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G002	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G003	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G004	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G005	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G006	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G007	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G008	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G009	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G010	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G011	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G012	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G013	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G014	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G015	Kleinhirn	0,00	707,33	863,78	3927,78	375,78
G016	Kleinhirn	0,00	3213,47	3989,04	18006,28	1726,92
G017	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G018	Kleinhirn		0,00	34,81	174,05	17,41
G019	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G020	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G021	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G022	Kleinhirn	104,09	0,00	137,91	605,00	16,91
G023	Kleinhirn	21,31	26,11	0,00	118,55	2,40
G024	Kleinhirn	0,00	35,97	28,22	160,48	15,46
G025	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G026	Kleinhirn	0,00		9,82	49,10	4,91
G027	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G028	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G029	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G030	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G031	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G032	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G033	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G034	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G035	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G036	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G037	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G038	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G039	Kleinhirn	26,13	0,00	22,19	120,80	1,97
G040	Kleinhirn	23,38	24,94	25,25	122,62	0,82
G041	Kleinhirn	25,31	0,00	27,67	132,45	1,18

## Anhang

<b>G042</b>	Kleinhirn	32,02	0,00	25,70	144,30	3,16
<b>G043</b>	Kleinhirn	0,00		4,59	22,95	2,30
<b>G044</b>	Kleinhirn	0,00	6,21	4,94	27,88	2,68
<b>G045</b>	Kleinhirn	23,01	26,72	21,80	119,22	2,09
<b>G046</b>	Kleinhirn	10,64	9,10	8,02	46,27	1,08
<b>G047</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G048</b>	Kleinhirn		2,80	3,67	16,18	0,44
<b>G049</b>	Kleinhirn	9,09	10,40	0,00	48,73	0,65
<b>G050</b>	Kleinhirn	10,42	13,89	0,00	60,78	1,74
<b>G051</b>	Kleinhirn	5,04	0,00	4,38	23,55	0,33
<b>G052</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G053</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G054</b>	Kleinhirn	9,35	10,95	12,73	63,65	1,38
<b>G055</b>	Kleinhirn	10,30	11,20	8,99	44,95	0,91
<b>G056</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G057</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G058</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G059</b>	Kleinhirn	11,18	12,62		297,50	0,72
<b>G060</b>	Kleinhirn	27,76	33,00		759,50	2,62
<b>G061</b>	Kleinhirn	1884,32		1566,07	43129,88	159,13
<b>G062</b>	Kleinhirn	40,15	34,32		930,88	2,92
<b>G063</b>	Kleinhirn		2144,35	1843,59	49849,25	150,38
<b>G064</b>	Kleinhirn		65,16	77,71	1785,88	6,27
<b>G065</b>	Kleinhirn	31,89	24,72		707,63	3,59
<b>G066</b>	Kleinhirn	6,69	6,16	0,00	160,63	0,26
<b>G067</b>	Kleinhirn	18,63			465,75	0,00
<b>G068</b>	Kleinhirn		777,93	798,37	19703,75	10,22
<b>G069</b>	Kleinhirn		45,04	37,21	1028,13	3,92
<b>G070</b>	Kleinhirn	112,69		96,42	2613,88	8,13
<b>G071</b>	Kleinhirn	0,62	0,67		16,01	0,03
<b>G072</b>	Kleinhirn		16,02	19,06	438,50	1,52
<b>G073</b>	Kleinhirn	0,62			15,48	0,00
<b>G074</b>	Kleinhirn	56,07	69,04		1563,88	6,48
<b>G075</b>	Kleinhirn	2,17	1,80		49,63	0,19
<b>G076</b>	Kleinhirn	21,95	20,13		526,00	0,91
<b>G077</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G078</b>	Kleinhirn			39,74	993,50	0,00
<b>G079</b>	Kleinhirn	4,27			106,75	0,00
<b>G080</b>	Kleinhirn	26,60	28,48		688,50	0,94
<b>G081</b>	Kleinhirn				0,00	0,00
<b>G082</b>	Kleinhirn	3,23		2,91	76,75	0,16
<b>G083</b>	Kleinhirn	77,12			1928,00	0,00
<b>G084</b>	Kleinhirn	143,46	131,35	153,65	3570,50	9,12
<b>G085</b>	Kleinhirn	53,11	49,32		1280,38	1,89
<b>G086</b>	Kleinhirn	28,68		22,20	636,00	3,24

## Anhang

<b>G087</b>	Kleinhirn		6,66		166,50	0,00
<b>G088</b>	Kleinhirn		726,38	672,63	17487,63	26,88
<b>G089</b>	Kleinhirn	67,74	69,72		1718,25	0,99
<b>G090</b>	Kleinhirn	48,34		56,77	1313,88	4,21
<b>G091</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G092</b>	Kleinhirn	227,11		219,06	5577,13	4,03
<b>G093</b>	Kleinhirn	15,55	12,88		355,38	1,34
<b>G094</b>	Kleinhirn		214,60	248,88	5793,50	17,14
<b>G095</b>	Kleinhirn	12,27	14,47		334,25	1,10
<b>G096</b>	Kleinhirn	47,59		59,05	1333,00	5,73
<b>G097</b>	Kleinhirn	28,37			709,25	0,00
<b>G098</b>	Kleinhirn		28,98		724,50	0,00
<b>G099</b>	Kleinhirn		2,25		56,25	0,00
<b>G100</b>	Kleinhirn	6,95			173,75	0,00

## Anhang

**Tabelle 31: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien mtDNA mit 4977 bp Deletion im Großhirngewebe (Mark). Werte (Rohdaten) mit über 20 % Abweichung wurden entfernt.**

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
G001	Großhirn		3,27	2,88	76,88	0,19
G002	Großhirn		46,20	43,65	1123,13	1,28
G003	Großhirn	137,30	42,06	6,32	1547,33	55,28
G004	Großhirn	1,75	0,00	0,00	43,75	0,00
G005	Großhirn		188,12	205,00	4914,00	8,44
G006	Großhirn	2,75		1,21	49,50	0,77
G007	Großhirn	0,00		0,42	10,53	0,00
G008	Großhirn	1,16	0,90		25,76	0,13
G009	Großhirn	0,00	52,94	57,19	1376,63	26,02
G010	Großhirn	0,00	1707,84	1774,63	43530,88	821,28
G011	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G012	Großhirn	1,75	0,00	1,75	43,75	0,00
G013	Großhirn	371,91	278,68		8132,38	46,61
G014	Großhirn	239,49	211,13		5632,75	14,18
G015	Großhirn		10,52		263,00	0,00
G016	Großhirn	18,12			453,00	0,00
G017	Großhirn	16,28			407,00	0,00
G018	Großhirn	45,26	46,66		1149,00	0,70
G019	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G020	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G021	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G022	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G023	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G024	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G025	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G026	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G027	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G028	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G029	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G030	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G031	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G032	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G033	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G034	Großhirn	0,21	0,00	0,00	5,23	0,00
G035	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G036	Großhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G037	Großhirn		66,90		1672,50	0,00
G038	Großhirn	32,28		39,05	891,63	3,38
G039	Großhirn	50,00		55,18	1314,75	2,59
G040	Großhirn		20,83		520,75	0,00
G041	Großhirn	265,39	240,97		6329,50	12,21

## Anhang

<b>G042</b>	Großhirn	54,14	57,93	50,44	1354,25	3,06
<b>G043</b>	Großhirn	59,69		59,46	1489,38	0,11
<b>G044</b>	Großhirn		9,83	11,22	263,13	0,70
<b>G045</b>	Großhirn		28,04	25,41	668,13	1,31
<b>G046</b>	Großhirn	44,74		47,49	1152,88	1,38
<b>G047</b>	Großhirn	408,31	396,85		10064,50	5,73
<b>G048</b>	Großhirn	4,47	3,53		100,00	0,47
<b>G049</b>	Großhirn	61,22		63,14	1554,50	0,96
<b>G050</b>	Großhirn	78,83	76,79		1945,25	1,02
<b>G051</b>	Großhirn	9,04			226,00	0,00
<b>G052</b>	Großhirn			6,65	166,25	0,00
<b>G053</b>	Großhirn	387,29	341,21	356,17	9038,92	19,19
<b>G054</b>	Großhirn		5,94		148,50	0,00
<b>G055</b>	Großhirn	572,90	499,32		13402,75	36,79
<b>G056</b>	Großhirn	882,61	869,34	774,84	21056,58	47,98
<b>G057</b>	Großhirn	165,93	169,41	143,00	3986,17	11,72
<b>G058</b>	Großhirn		67,94	63,75	1646,13	2,10
<b>G059</b>	Großhirn	221,30	229,54		5635,50	4,12
<b>G060</b>	Großhirn			341,31	8532,75	0,00
<b>G061</b>	Großhirn	179,71	211,28		4887,38	15,79
<b>G062</b>	Großhirn	64,36			1609,00	0,00
<b>G063</b>	Großhirn	89,32	106,97		2453,63	8,82
<b>G064</b>	Großhirn	55,45			1386,25	0,00
<b>G065</b>	Großhirn	33,63	31,64	30,91	801,50	1,15
<b>G066</b>	Großhirn			100,06	2501,50	0,00
<b>G067</b>	Großhirn		10,18		254,50	0,00
<b>G068</b>	Großhirn	183,42	156,26		4246,00	13,58
<b>G069</b>	Großhirn		184,25	181,04	4566,13	1,61
<b>G070</b>	Großhirn	350,49	395,84		9329,13	22,68
<b>G071</b>	Großhirn		10,95		273,75	0,00
<b>G072</b>	Großhirn	2222,09		2154,26	54704,38	33,92
<b>G073</b>	Großhirn			278,88	6972,00	0,00
<b>G074</b>	Großhirn	300,23			7505,75	0,00
<b>G075</b>	Großhirn	21,29	24,78		575,88	1,75
<b>G076</b>	Großhirn	1737,43			43435,75	0,00
<b>G077</b>	Großhirn	144,26	178,55		4035,13	17,15
<b>G078</b>	Großhirn	193,12	159,36		4406,00	16,88
<b>G079</b>	Großhirn	239,47	211,76	225,10	5636,08	11,32
<b>G080</b>	Großhirn		303,16	374,71	8473,38	35,77
<b>G081</b>	Großhirn	7,20			180,00	0,00
<b>G082</b>	Großhirn	32,78	32,29		813,38	0,25
<b>G083</b>	Großhirn		29,49		737,25	0,00
<b>G084</b>	Großhirn		1241,85		31046,25	0,00
<b>G085</b>	Großhirn		29,85		746,25	0,00
<b>G086</b>	Großhirn		26,85	331,01	4473,25	152,08

## Anhang

<b>G087</b>	Großhirn	31,78			794,50	0,00
<b>G088</b>	Großhirn		0,05	0,03	1,02	0,01
<b>G089</b>	Großhirn	6,67		10,21	211,00	1,77
<b>G090</b>	Großhirn		183,50	147,92	4142,75	17,79
<b>G091</b>	Großhirn		145,33	134,00	3491,63	5,66
<b>G092</b>	Großhirn		241,06	192,05	5413,88	24,51
<b>G093</b>	Großhirn	36,71			917,75	0,00
<b>G094</b>	Großhirn		57,92	59,78	1471,25	0,93
<b>G095</b>	Großhirn	203,34	172,51		4698,13	15,42
<b>G096</b>	Großhirn	365,87	292,17		8225,50	36,85
<b>G097</b>	Großhirn	52,73	64,63		1467,00	5,95
<b>G098</b>	Großhirn		3,32		83,00	0,00
<b>G099</b>	Großhirn	450,37	421,34	401,04	10606,25	20,24
<b>G100</b>	Großhirn	281,70	325,48		7589,75	21,89

## Anhang

**Tabelle 32: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien mtDNA mit 4977 bp Deletion im Kleinhirngewebe (Mark).** Werte (Rohdaten) mit über 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
G001	Kleinhirn	16,86	7,66		306,50	4,60
G002	Kleinhirn	183,97	166,77		4169,25	8,60
G003	Kleinhirn	359,06	383,29	397,34	9497,42	15,81
G004	Kleinhirn		98,78	38,67	1718,13	30,06
G005	Kleinhirn	2681,22	2606,80		66100,25	37,21
G006	Kleinhirn		162,91	140,95	3798,25	10,98
G007	Kleinhirn	17,03	14,25		391,00	1,39
G008	Kleinhirn		517,06	461,37	12230,38	27,84
G009	Kleinhirn	345,07		406,88	9399,38	30,90
G010	Kleinhirn		1455,25	1682,71	39224,50	113,73
G011	Kleinhirn			11,68	292,00	0,00
G012	Kleinhirn	151,49	138,99		3631,00	6,25
G013	Kleinhirn	2139,02	2478,70		57721,50	169,84
G014	Kleinhirn	588,57	594,57	532,08	14293,50	28,15
G015	Kleinhirn		1176,95		29423,75	0,00
G016	Kleinhirn		406,02		10150,50	0,00
G017	Kleinhirn	79,16		94,39	2169,38	7,61
G018	Kleinhirn	389,01	331,56		9007,13	28,73
G019	Kleinhirn		79,52	94,64	2177,00	7,56
G020	Kleinhirn	78,16	63,76		1774,00	7,20
G021	Kleinhirn	580,01		670,86	15635,88	45,43
G022	Kleinhirn	340,81	338,36		8489,63	1,22
G023	Kleinhirn	285,45	290,38		7197,88	2,47
G024	Kleinhirn		61,84		1546,00	0,00
G025	Kleinhirn	54,16			1354,00	0,00
G026	Kleinhirn		465,23		11630,75	0,00
G027	Kleinhirn	399,31	329,43		9109,25	34,94
G028	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G029	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G030	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G031	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G032	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G033	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G034	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G035	Kleinhirn		0,56		13,98	0,00
G036	Kleinhirn		1065,47		26636,75	0,00
G037	Kleinhirn		87,32	98,85	2327,13	5,77
G038	Kleinhirn		26,45		0,00	0,00
G039	Kleinhirn			100,22	2505,50	0,00
G040	Kleinhirn	86,30	96,51		2285,13	5,10
G041	Kleinhirn		211,26	194,85	5076,38	8,21

## Anhang

<b>G042</b>	Kleinhirn		19,06		476,50	0,00
<b>G043</b>	Kleinhirn	63,60	72,35	70,86	1723,42	3,82
<b>G044</b>	Kleinhirn	75,42		81,71	1964,13	3,14
<b>G045</b>	Kleinhirn	66,45	73,19		1745,50	3,37
<b>G046</b>	Kleinhirn	26,36	29,20		694,50	1,42
<b>G047</b>	Kleinhirn		6,76		169,00	0,00
<b>G048</b>	Kleinhirn		34,92	35,38	878,75	0,23
<b>G049</b>	Kleinhirn		83,48	70,69	1927,13	6,39
<b>G050</b>	Kleinhirn	215,80	258,20	267,77	6181,42	22,58
<b>G051</b>	Kleinhirn		67,67		1691,75	0,00
<b>G052</b>	Kleinhirn	18,69			467,25	0,00
<b>G053</b>	Kleinhirn		47,32		1183,00	0,00
<b>G054</b>	Kleinhirn		28,35		708,75	0,00
<b>G055</b>	Kleinhirn		238,70		5967,50	0,00
<b>G056</b>	Kleinhirn		31,58		789,50	0,00
<b>G057</b>	Kleinhirn		624,51	553,10	14720,13	35,70
<b>G058</b>	Kleinhirn	748,45		757,05	18711,25	4,30
<b>G059</b>	Kleinhirn		114,49	99,17	2670,75	7,66
<b>G060</b>	Kleinhirn	224,80			5620,00	0,00
<b>G061</b>	Kleinhirn		62,74		1568,50	0,00
<b>G062</b>	Kleinhirn	19,19	19,31		481,25	0,06
<b>G063</b>	Kleinhirn	126,32	146,09		3405,13	9,89
<b>G064</b>	Kleinhirn		361,22	364,52	9071,75	1,65
<b>G065</b>	Kleinhirn		5,13		128,25	0,00
<b>G066</b>	Kleinhirn	36,88			922,00	0,00
<b>G067</b>	Kleinhirn		64,16		1604,00	0,00
<b>G068</b>	Kleinhirn		646,40	559,92	15079,00	43,24
<b>G069</b>	Kleinhirn		14,58	11,60	327,25	1,49
<b>G070</b>	Kleinhirn			1431,56	35789,00	0,00
<b>G071</b>	Kleinhirn	90,26			2256,50	0,00
<b>G072</b>	Kleinhirn		47,10	55,50	1282,50	4,20
<b>G073</b>	Kleinhirn		8,27		206,75	0,00
<b>G074</b>	Kleinhirn	161,66		172,74	4180,00	5,54
<b>G075</b>	Kleinhirn		38,72		968,00	0,00
<b>G076</b>	Kleinhirn	344,40			8610,00	0,00
<b>G077</b>	Kleinhirn	10,80	11,98		284,75	0,59
<b>G078</b>	Kleinhirn	7,46	7,44		186,25	0,01
<b>G079</b>	Kleinhirn		27,43	34,57	775,00	3,57
<b>G080</b>	Kleinhirn		22,44		561,00	0,00
<b>G081</b>	Kleinhirn	42,83			1070,75	0,00
<b>G082</b>	Kleinhirn		11,39	10,60	274,88	0,39
<b>G083</b>	Kleinhirn			349,42	8735,50	0,00
<b>G084</b>	Kleinhirn	1276,82	1053,63		29130,63	111,60
<b>G085</b>	Kleinhirn			51,55	1288,75	0,00
<b>G086</b>	Kleinhirn	43,96	53,65		1220,13	4,84

## Anhang

<b>G087</b>	Kleinhirn	7,52			188,00	0,00
<b>G088</b>	Kleinhirn			2,41	60,25	0,00
<b>G089</b>	Kleinhirn	0,00	0,00		0,00	0,00
<b>G090</b>	Kleinhirn		43,14	59,05	1277,38	7,96
<b>G091</b>	Kleinhirn	182,95		180,05	4537,50	1,45
<b>G092</b>	Kleinhirn		314,81		7870,25	0,00
<b>G093</b>	Kleinhirn			30,84	771,00	0,00
<b>G094</b>	Kleinhirn	284,42	224,51		6361,63	29,95
<b>G095</b>	Kleinhirn	53,97	51,09	48,17	1276,92	2,37
<b>G096</b>	Kleinhirn		14,12	19,29	417,63	2,59
<b>G097</b>	Kleinhirn	35,46		42,61	975,88	3,58
<b>G098</b>	Kleinhirn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>G099</b>	Kleinhirn		2,28	2,53	60,13	0,13
<b>G100</b>	Kleinhirn	0,00	10,60		265,00	0,00

## Anhang

### 9.7.2 Daten der Formalinstudie

**Tabelle 33: Probendaten.** Aufgeführt sind das Alter der Verstorbenen, das Geschlecht und die Todesursache.

Probennummer	Geschlecht	Alter	Todesursache
1/6	männlich	47	Herzinfarkt
2/6	männlich	46	morphologisch nicht geklärt
3/6	weiblich	67	Hyperthermie
4/6	männlich	62	Herzinfarkt
5/6	weiblich	49	Lungenembolie
6/6	weiblich	53	morphologisch nicht geklärt, Herztod ?

**Tabelle 34: Gesamtproteinkonzentration.** Angeben sind alle drei Messungen und die Standardabweichung.

Probennr.	Messung 1 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	Messung 2 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	Messung 3 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	Messung 4 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	Mittelwert ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	Standardabweichung ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )
1 GH frisch	133,90	139,75	271,75	176,06	180,37	55,179
1 KH frisch	125,06	106,77	183,59	163,29	144,67	30,340
2 GH frisch	108,65	140,06	186,77	163,66	149,79	28,928
2 KH frisch	153,34	141,27	258,45	211,49	191,14	47,065
3 GH frisch	166,50	157,20	191,23	219,88	183,70	24,312
3 KH frisch	91,44	142,59	172,81	242,18	162,26	54,543
4 GH frisch	218,68	94,98	151,05	229,30	173,50	54,370
4 KH frisch	0,00	88,07	215,50	246,16	137,43	99,046
5 GH frisch	137,03	144,48	174,99	312,82	192,33	71,004
5 KH frisch	128,26	170,10	190,73	205,66	173,69	29,109
6 GH frisch	134,07	167,13	241,51	222,49	191,30	42,877
6 KH frisch	167,14	124,58	189,84	174,60	164,04	24,207
1 GH 30 min	47,26	39,80	102,25	76,08	66,35	24,764
1 KH 30 min	76,04	58,01	42,27	119,86	74,04	29,024
2 GH 30 min	65,58	73,99	117,99	95,09	88,16	20,302
2 KH 30 min	50,61	46,27	197,88	87,72	95,62	61,198
3 GH 30 min	37,86	29,47	110,47	87,59	66,35	33,799
3 KH 30 min	32,40	131,55	98,17	109,19	92,83	36,903
4 GH 30 min	46,14	38,57	101,22	107,61	73,39	31,227
4 KH 30 min	50,38	105,58	68,50	123,75	87,05	29,066
5 GH 30 min	132,57	142,25	70,00	142,34	121,79	30,165
5 KH 30 min	145,17	113,92	131,22	107,30	124,40	14,831
6 GH 30 min	127,63	98,20	120,96	121,32	117,03	11,189

## Anhang

6 KH 30 min	163,51	140,82	150,80	93,12	137,06	26,615
1 GH 1 std	25,01	16,44	111,07	65,49	54,50	37,548
1 KH 1 std	41,79	74,19	78,45	104,16	74,65	22,167
2 GH 1 std	32,93	41,80	89,67	63,22	56,90	21,888
2 KH 1 std	41,83	46,01	113,36	110,71	77,98	34,103
3 GH 1 std	24,14	72,95	130,03	137,38	91,12	46,018
3 KH 1 std	38,15	74,74	132,61	125,85	92,84	38,697
4 GH 1 std	13,63	54,19	88,87	96,19	63,22	32,733
4 KH 1 std	46,64	61,19	92,14	129,28	82,31	31,706
5 GH 1 std	139,75	42,08	25,49	70,07	69,35	43,658
5 KH 1 std	155,39	65,04	93,76	80,93	98,78	34,232
6 GH 1 std	113,23	55,70	125,79	91,17	96,47	26,603
6 KH 1 std	140,76	54,84	98,18	98,17	97,99	30,375
3 GH 2 std	118,26	72,51	65,04	115,43	92,81	24,200
3 KH 2 std	125,37	82,25	71,25	96,46	93,83	20,284
4 GH 2 std	65,73	53,62	54,35	61,02	58,68	4,987
4 KH 2 std	74,87	64,19	88,22	117,48	86,19	19,972
5 GH 2 std	83,71	91,35	45,41	74,14	73,65	17,407
5 KH 2 std	66,98	88,40	76,98	33,25	66,40	20,585
6 GH 2 std	54,56	57,90	71,61	79,45	65,88	10,110
6 KH 2 std	78,28	28,58	67,60	57,50	57,99	18,501
3 GH 4 std	111,75	110,79	49,94	32,42	76,22	35,588
3 KH 4 std	142,01	92,16	46,36	67,00	86,89	35,722
4 GH 4 std	142,69	97,21	58,28	94,42	98,15	29,952
4 KH 4 std	115,75	101,85	35,98	87,14	85,18	30,152
5 GH 4 std	76,61	75,69	48,82	88,95	72,52	14,649
5 KH 4 std	46,77	53,38	37,18	82,24	54,89	16,807
6 GH 4 std	62,00	66,85	88,67	74,91	73,11	10,098
6 KH 4 std	25,07	65,40	30,85	27,20	37,13	16,452
3 GH 6 std	80,86	49,85	17,50	43,33	47,89	22,556
3 KH 6 std	90,85	85,43	29,56	51,36	64,30	25,126
4 GH 6 std	104,14	51,04	30,71	47,55	58,36	27,529
4 KH 6 std	99,00	99,04	22,32	95,90	79,07	32,788
5 GH 6 std	89,24	59,15	27,63	31,42	51,86	24,775
5 KH 6 std	25,99	36,94	21,61	69,23	38,44	18,632
6 GH 6 std	27,86	48,56	42,68	29,30	37,10	8,785
6 KH 6 std	30,22	57,08	40,34	45,65	43,32	9,687
3 GH 8 std	99,30	77,73	14,61	61,58	63,31	31,138
3 KH 8 std	102,11	62,02	16,20	58,84	59,79	30,401
4 GH 8 std	63,92	61,89	42,64	43,32	52,94	9,991
4 KH 8 std	69,40	46,70	31,30	50,70	49,52	13,571
5 GH 8 std	50,96	42,09	27,02	41,77	40,46	8,594
5 KH 8 std	56,06	64,53	33,39	27,22	45,30	15,448
6 GH 8 std	37,41	40,00	21,02	40,91	34,84	8,079
6 KH 8 std	43,11	42,77	31,12	45,13	40,53	5,509

## Anhang

3 GH 10 std	54,79	52,43	28,09	62,36	49,41	12,846
3 KH 10 std	111,82	124,39	24,24	59,94	80,10	40,295
4 GH 10 std	103,89	104,92	58,08	68,70	83,90	20,854
4 KH 10 std	84,28	78,08	28,07	48,48	59,73	22,739
5 GH 10 std	67,13	101,34	37,43	57,44	65,84	23,129
5 KH 10 std	78,50	88,21	44,26	34,63	61,40	22,483
6 GH 10 std	78,98	80,06	63,58	34,25	64,22	18,488
6 KH 10 std	70,06	81,53	73,61	43,55	67,19	14,263
1 GH 12 std	1,15	0,00	15,82	20,52	92,81	8,964
1 KH 12 std	7,94	4,75	23,97	57,89	93,83	21,075
2 GH 12 std	8,99	0,00	33,55	25,75	58,68	13,263
2 KH 12 std	13,16	20,12	80,28	62,65	86,19	28,217
3 GH 12 std	6,88	3,60	16,39	38,82	73,65	13,760
3 KH 12 std	6,84	62,37	40,72	40,42	66,40	19,860
4 GH 12 std	12,76	33,25	48,42	77,90	65,88	23,751
4 KH 12 std	0,34	16,13	48,42	100,78	57,99	38,405
5 GH 12 std	63,19	13,66	26,66	50,28	76,22	19,400
5 KH 12 std	59,74	4,49	22,57	29,27	86,89	19,922
6 GH 12 std	60,07	15,64	57,62	35,58	98,15	18,072
6 KH 12 std	65,76	28,42	34,58	49,63	85,18	14,451
1 GH 1 tag	0,00	34,77	18,62	34,52	72,52	14,277
1 KH 1 tag	0,72	48,32	10,62	22,34	54,89	17,792
2 GH 1 tag	4,09	16,70	21,51	42,85	73,11	13,977
2 KH 1 tag	1,23	50,66	50,87	74,87	37,13	26,802
3 GH 1 tag	9,63	35,55	13,97	30,95	47,89	10,958
3 KH 1 tag	9,05	88,13	34,00	35,20	64,30	28,824
4 GH 1 tag	1,33	55,30	66,07	74,16	58,36	28,445
4 KH 1 tag	10,15	57,45	31,37	64,71	79,07	21,662
5 GH 1 tag	26,16	34,11	30,62	64,10	51,86	14,906
5 KH 1 tag	48,81	49,40	29,12	70,58	38,44	14,665
6 GH 1 tag	75,34	60,65	56,58	60,11	37,10	7,198
6 KH 1 tag	26,44	31,18	42,03	21,82	43,32	7,503
1 GH 3 tage	5,95	32,47	18,44	26,07	63,31	9,878
1 KH 3 tage	10,81	37,73	9,90	36,79	59,79	13,461
2 GH 3 tage	9,68	35,97	24,36	28,79	52,94	9,609
2 KH 3 tage	10,58	45,01	57,00	56,15	49,52	18,850
3 GH 3 tage	5,06	40,38	25,26	44,22	40,46	15,395
3 KH 3 tage	10,98	92,92	20,35	87,52	45,30	37,473
1 GH 3 tage	9,38	54,03	38,43	59,01	34,84	19,352
1 KH 3 tage	20,52	37,79	39,99	53,24	40,53	11,639
2 GH 3 tage	26,29	28,35	36,90	58,82	49,41	12,884
2 KH 3 tage	19,74	26,95	10,53	55,82	80,10	16,943
3 GH 3 tage	27,16	32,59	36,89	38,83	83,90	4,484
3 KH 3 tage	37,05	48,99	45,83	35,28	59,73	5,766
4 GH 3 tage	3,21	46,47	20,44	28,19	65,84	15,542

## Anhang

4 KH 3 tage	2,03	48,64	14,75	37,83	61,40	18,397
5 GH 3 tage	7,36	45,93	54,29	26,09	64,22	18,200
5 KH 3 tage	9,96	50,67	62,66	42,57	67,19	19,545
6 GH 3 tage	6,23	78,23	27,29	51,83	92,81	26,925
6 KH 3 tage	2,90	75,43	19,67	53,22	93,83	28,287
1 GH 1 woche	1,49	81,53	50,35	82,27	58,68	32,894
1 KH 1 woche	4,75	40,33	39,44	90,29	86,19	30,487
2 GH 1 woche	38,40	35,60	38,22	40,43	73,65	1,715
2 KH 1 woche	42,23	46,51	18,18	29,18	66,40	11,155
3 GH 1 woche	19,48	30,81	28,95	28,92	65,88	4,428
3 KH 1 woche	44,80	41,61	52,03	32,37	57,99	7,058
4 GH 1 woche	48,82	17,60	27,08	36,84	76,22	11,582
4 KH 1 woche	44,64	29,59	24,20	41,92	86,89	8,466
5 GH 1 woche	60,60	22,75	44,35	49,43	98,15	13,750
5 KH 1 woche	68,03	25,89	65,44	53,57	85,18	16,700
6 GH 1 woche	60,16	25,29	28,79	42,05	72,52	13,687
6 KH 1 woche	78,06	43,84	22,54	39,98	54,89	20,120
1 GH 1 monat	52,18	35,98	48,61	81,82	73,11	16,803
1 KH 1 monat	71,75	42,86	58,11	57,04	37,13	10,225
2 GH 1 monat	27,15	33,76	28,11	35,19	47,89	3,476
2 KH 1 monat	4,59	23,93	38,52	39,53	64,30	14,148
3 GH 1 monat	41,11	42,01	52,45	34,41	58,36	6,454
3 KH 1 monat	23,64	43,22	36,88	31,46	79,07	7,192
4 GH 1 monat	37,46	25,78	52,51	33,57	51,86	9,720
5 GH 1 monat	56,04	32,20	29,83	44,86	38,44	10,523
5 KH 1 monat	33,67	24,05	39,41	31,51	37,10	5,502
6 GH 1 monat	68,83	31,68	74,35	51,22	43,32	16,694
6 KH 1 monat	63,37	28,69	25,29	53,38	63,31	16,129
1 GH 3 monate	68,55	33,80	31,16	46,11	59,79	14,772
1 KH 3 monate	74,46	49,16	62,15	59,82	52,94	8,994
2 GH 3 monate	77,21	55,99	58,02	61,48	49,52	8,340
2 KH 3 monate	31,19	29,33	30,67	30,84	40,46	0,705
3 GH 3 monate	35,89	38,56	11,81	40,36	45,30	11,565
3 KH 3 monate	39,73	40,53	38,08	37,05	34,84	1,362
4 GH 3 monate	45,13	42,09	40,52	32,36	40,53	4,726
4 KH 3 monate	1,15	0,00	15,82	20,52	49,41	8,964
5 GH 3 monate	7,94	4,75	23,97	57,89	80,10	21,075
5 KH 3 monate	8,99	0,00	33,55	25,75	83,90	13,263
6 GH 3 monate	13,16	20,12	80,28	62,65	59,73	28,217

## Anhang

**Tabelle 35: Mittels RT-qPCR bestimmte Menge nukleärer DNA im Großhirngewebe.** Werte mit mehr als 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probennr.	Gewebe	Messung 1 (ng / 2 µl)	Messung 2 (ng / 2 µl)	Messung 3 (ng / 2 µl)	Mittelwert (ng / µl)	Standardabweichung (ng / µl)
1	GH Frisch	102,73		123,69	1132,10	10,480
1	GH 30 Minuten	123,47	132,55	132,91	64,82	4,368
1	GH 1 Stunde		29,54	26,73	14,07	1,405
1	GH 12 Stunde		3,3	3,04	1,59	0,130
1	GH 1 Tag	11,87	9,28	12,24	5,57	1,317
1	GH 3 Tage		3,55	4,66	2,05	0,555
1	GH 1 Woche	6,45		5,46	2,98	0,495
1	GH 1 Monat	86,74	79,74	72,74	39,87	5,715
1	GH 3 Monate	9,29		11,86	5,29	1,285
2	GH Frisch	575,64	521,99		274,41	26,825
2	GH 30 Minuten	48,46	38,74		21,80	4,860
2	GH 1 Stunde	32,4	34,06		16,62	0,830
2	GH 12 Stunde	1,56		1,28	7,10	0,140
2	GH 1 Tag	1,63	1,27		7,25	0,180
2	GH 3 Tage	0,671		0,688	3,40	0,008
2	GH 1 Woche	0,206		0,273	1,20	0,034
2	GH 1 Monat	0,887		0,934	4,55	0,024
2	GH 3 Monate	15,96	16,16	15,84	7,99	0,132
3	GH Frisch	12,11	14,79	15,01	139,70	1,318
3	GH 30 Minuten		113,61	100,06	53,42	6,775
3	GH 1 Stunde		26,75	32,66	14,85	2,955
3	GH 2 Stunden	49,65	33,23		20,72	8,210
3	GH 4 Stunden	27,21	30,73	28,19	14,36	1,483
3	GH 6 Stunden	39,21	40,27	43,6	20,51	1,870
3	GH 8 Stunden	24,63	26,06	26,9	12,93	0,937
3	GH 10 Stunden		39,92	34,03	18,49	2,945
3	GH 12 Stunden		6,27	5,68	2,99	0,295
3	GH 1 Tag	3,94	3,52		1,87	0,210
3	GH 3 Tage	11,43	13,97		6,35	1,270
3	GH 1 Woche		7,91	9,14	4,26	0,615
3	GH 1 Monat	2,3	2,94	2,82	1,34	0,278
3	GH 3 Monate	4,19	4,83	5,16	2,36	0,403
4	GH Frisch	232,68		269,75	125,61	18,535
4	GH 30 Minuten	88,79	96,27	94,25	46,55	3,160
4	GH 1 Stunde	72,6	75,37	82,73	38,45	4,275
4	GH 2 Stunden	59,32	55,38	67,94	30,44	5,245
4	GH 4 Stunden	28,19	32,67		15,22	2,240
4	GH 6 Stunden	21,7	23,66	17,81	10,53	2,431
4	GH 8 Stunden	12,5	12,14	12,47	6,19	0,163
4	GH 10 Stunden	15	12,23		6,81	1,385
4	GH 12 Stunden		8,87	7,02	3,97	0,925

## Anhang

4	GH 1 Tag	10,95	9,32	11,72	<b>5,33</b>	<b>1,001</b>
4	GH 3 Tage	18,51	23,6		<b>10,53</b>	<b>2,545</b>
4	GH 1 woche	10,57	9,82	10,98	<b>5,23</b>	<b>0,480</b>
4	GH 1 Monat	15,13	18,76		<b>8,47</b>	<b>1,815</b>
4	GH 3 Monate		7,42	6,67	<b>3,52</b>	<b>0,375</b>
5	GH Frisch		52,64	47,3	<b>499,70</b>	<b>2,670</b>
5	GH 30 minuten	237,54	203,75	256,51	<b>116,30</b>	<b>21,821</b>
5	GH 1 Stunde		77,32	85,02	<b>40,59</b>	<b>3,850</b>
5	GH 2 Stunden	138	145,78	127,94	<b>68,62</b>	<b>7,303</b>
5	GH 4 Stunden	129,52	121,41	128,35	<b>63,21</b>	<b>3,579</b>
5	GH 6 Stunden	31,42	37,41	35,08	<b>17,32</b>	<b>2,465</b>
5	GH 8 Stunden	42,77	38,83	44,91	<b>21,09</b>	<b>2,518</b>
5	GH 10 Stunden		13,47	13,82	<b>6,82</b>	<b>0,175</b>
5	GH 12 Stunden	28,87	25,83	30,37	<b>14,18</b>	<b>1,889</b>
5	GH 1 Tag		152,07	161,95	<b>78,51</b>	<b>4,940</b>
5	GH 3 Tage	45,63	44,59	47,83	<b>23,01</b>	<b>1,351</b>
5	GH 1 woche	32,3	41,33		<b>18,41</b>	<b>4,515</b>
5	GH 1 Monat		16,16	19,9	<b>9,02</b>	<b>1,870</b>
5	GH 3 Monate	15,61		17,15	<b>8,19</b>	<b>0,770</b>
6	GH Frisch	22,09	21,36		<b>217,25</b>	<b>0,365</b>
6	GH 30 minuten	426,13	341,31		<b>1918,60</b>	<b>42,410</b>
6	GH 1 Stunde	38,65	36,81	42,67	<b>196,88</b>	<b>2,447</b>
6	GH 2 Stunden	230,53	268,41	222,52	<b>120,24</b>	<b>20,014</b>
6	GH 4 Stunden	219,63	177,6	190,78	<b>98,00</b>	<b>17,552</b>
6	GH 6 Stunden	166,84	188,38	191,19	<b>91,07</b>	<b>10,877</b>
6	GH 8 Stunden		146,54	142,67	<b>72,30</b>	<b>1,935</b>
6	GH 10 Stunden	173,38	192,96	231,41	<b>99,63</b>	<b>24,105</b>
6	GH 12 Stunden	425,64		527,51	<b>238,29</b>	<b>50,935</b>
6	GH 1 Tag	88,07	97,17	92,59	<b>463,05</b>	<b>3,715</b>
6	GH 3 Tage	169,57		209,52	<b>94,77</b>	<b>19,975</b>
6	GH 1 woche	134,28	137,64	133,54	<b>67,58</b>	<b>1,784</b>
6	GH 1 Monat	125,82	125,89		<b>62,93</b>	<b>0,035</b>
6	GH 3 Monate	21,49	22,95		<b>11,11</b>	<b>0,730</b>

## Anhang

**Tabelle 36: Mittels RT-qPCR bestimmte Menge nukleärer DNA im Kleinhirngewebe.** Werte mit mehr als 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probennr.	Gewebe	Messung 1 (ng / 2 µl)	Messung 2 (ng / 2 µl)	Messung 3 (ng / 2 µl)	Mittelwert (ng / µl)	Standardabweichung (ng / µl)
1	KH Frisch	6,37	6,35	5,35	<b>60,23</b>	0,476
1	KH 30 minuten		20,64	25,7	<b>11,59</b>	2,530
1	KH 1 Stunde	7,01	6,6		<b>34,03</b>	0,205
1	KH 12 Stunde	22,41	19,95	24,98	<b>11,22</b>	2,054
1	KH 1 Tag	14,72		13,03	<b>6,94</b>	0,845
1	KH 3 Tage		12,33	15,42	<b>6,94</b>	1,545
1	KH 1 woche	5,58	6,76		<b>3,09</b>	0,590
1	KH 1 Monat				<b>0,00</b>	
1	KH 3 Monate	49,79	53,83		<b>25,91</b>	2,020
2	KH Frisch	6,37	6,35	5,35	<b>3,01</b>	0,476
2	KH 30 minuten	92,48	114,01		<b>51,62</b>	10,765
2	KH 1 Stunde	79,05	63,91		<b>35,74</b>	7,570
2	KH 12 Stunde	2,95	2,72	2,97	<b>14,40</b>	0,113
2	KH 1 Tag	1,11	1,11		<b>5,55</b>	0,000
2	KH 3 Tage	0,88	0,715		<b>3,99</b>	0,083
2	KH 1 woche		4,75	5,86	<b>26,53</b>	0,555
2	KH 1 Monat	16,78	16,22	16,27	<b>82,12</b>	0,253
2	KH 3 Monate		6,77	6,28	<b>3,26</b>	0,245
3	KH Frisch	269,36		281,82	<b>137,80</b>	6,230
3	KH 30 minuten	9,99		10,41	<b>5,10</b>	0,210
3	KH 1 Stunde	140,01	141,61	153,05	<b>72,45</b>	5,807
3	KH 2 Stunden	51,04	53,69	62,05	<b>27,80</b>	4,692
3	KH 4 Stunden	15,7		12,62	<b>7,08</b>	1,540
3	KH 6 Stunden	45,29	48,39	58,01	<b>25,28</b>	5,416
3	KH 8 Stunden	17,93	16,74	15,2	<b>8,31</b>	1,118
3	KH 10 Stunden	13,18	13,02	14,51	<b>6,79</b>	0,668
3	KH 12 Stunden	5,08	5,46	7,55	<b>3,02</b>	1,086
3	KH 1 Tag		21,86	19,11	<b>10,24</b>	1,375
3	KH 3 Tage	5,65	4,64	6,21	<b>2,75</b>	0,650
3	KH 1 woche	4,43	6,09	4,36	<b>2,48</b>	0,800
3	KH 1 Monat	29,59	26,41		<b>14,00</b>	1,590
3	KH 3 Monate	6,1	4,9	5,42	<b>2,74</b>	0,491
4	KH Frisch	1,76	2,17	2,17	<b>20,33</b>	0,193
4	KH 30 minuten		384,46	377,42	<b>190,47</b>	3,520
4	KH 1 Stunde	128,75	111,84		<b>60,15</b>	8,455
4	KH 2 Stunden	18,15	19,8	16,94	<b>9,15</b>	1,172
4	KH 4 Stunden	19,41	20,27	22,73	<b>10,40</b>	1,407
4	KH 6 Stunden	10,22	10,32	10,18	<b>5,12</b>	0,059
4	KH 8 Stunden	17,05		16,82	<b>8,47</b>	0,115
4	KH 10 Stunden	70,61	71,96		<b>35,64</b>	0,675
4	KH 12 Stunden	7,96	7,71		<b>3,92</b>	0,125

## Anhang

4	KH 1 Tag	23,96	26,08	23,33	<b>12,23</b>	1,176
4	KH 3 Tage	11,35	9,16	10,18	<b>5,12</b>	0,895
4	KH 1 woche	38,48	39,88		<b>19,59</b>	0,700
4	KH 1 Monat		137,17	145,96	<b>70,78</b>	4,395
4	KH 3 Monate	41,66		39,47	<b>20,28</b>	1,095
5	KH Frisch		76,9	74,02	<b>754,60</b>	1,440
5	KH 30 minuten	73,48	85,51	70,92	<b>766,37</b>	6,361
5	KH 1 Stunde	53,8	47,17	45,49	<b>488,20</b>	3,588
5	KH 2 Stunden	46,73	44,03		<b>22,69</b>	1,350
5	KH 4 Stunden	21,41	22,55	19,84	<b>10,63</b>	1,111
5	KH 6 Stunden	2,9	3,52	3,04	<b>1,58</b>	0,265
5	KH 8 Stunden	123,27	117,03	106,04	<b>57,72</b>	7,123
5	KH 10 Stunden	20,36	22,79	26,64	<b>11,63</b>	2,586
5	KH 12 Stunden	98,79	89,6	101,06	<b>48,24</b>	4,955
5	KH 1 Tag	121,19	128,87	122,16	<b>62,04</b>	3,415
5	KH 3 Tage	60,3	51,23		<b>27,88</b>	4,535
5	KH 1 woche		11,04	8,86	<b>4,98</b>	1,090
5	KH 1 Monat	21,76		19,64	<b>10,35</b>	1,060
5	KH 3 Monate	6,15	6,12	23,2	<b>5,91</b>	8,045
6	KH Frisch	128,75	116,16	137,82	<b>63,79</b>	8,881
6	KH 30 minuten	60,05	57,56	56,19	<b>579,33</b>	1,598
6	KH 1 Stunde	26,21	20,02	26	<b>120,38</b>	2,870
6	KH 2 Stunden		88,35	79,17	<b>41,88</b>	4,590
6	KH 4 Stunden	17,84	16,44	13,21	<b>7,92</b>	1,939
6	KH 6 Stunden	67,89	77,56	72,62	<b>36,35</b>	3,948
6	KH 8 Stunden	34,61	39,57	36,29	<b>18,41</b>	2,060
6	KH 10 Stunden	12,92	12,99	12,89	<b>6,47</b>	0,042
6	KH 12 Stunden	59,09	54,86	65,74	<b>29,95</b>	4,478
6	KH 1 Tag		23,24	18,94	<b>10,55</b>	2,150
6	KH 3 Tage	249,66	280,56	230,62	<b>126,81</b>	20,579
6	KH 1 woche		191,83	156,62	<b>87,11</b>	17,605
6	KH 1 Monat		64,26	80,27	<b>36,13</b>	0,476
6	KH 3 Monate	149,42	156,89	159,55	<b>77,64</b>	2,530

## Anhang

**Tabelle 37: : Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien Wildtyp mtDNA im Großhirngewebe**

Werte (Rohdaten) mit mehr als 20% Abweichung wurde entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
1	GH Frisch	14700000	15400000		75250000,00	350000,000
1	GH 30 minuten	13400000	11600000	11700000	6116666,67	825967,446
1	GH 1 Stunde	9870000	8510000	8880000	4543333,33	574127,357
1	GH 12 Stunde		856441,44	811907,13	417087,14	22267,155
1	GH 1 Tag	2550000	2040000	2250000	1140000,00	209284,495
1	GH 3 Tage	1260000	1190000	1150000	600000,00	45460,606
1	GH 1 woche	968600,19	988828,13	987821,75	490875,01	9307,409
1	GH 1 Monat		1300000	1290000	647500,00	5000,000
1	GH 3 Monate		160025,8	159702,06	79931,97	161,870
2	GH Frisch	3550000	3690000	4120000	18933333,33	242532,930
2	GH 30 minuten	7120000	7430000	7650000	3700000,00	217408,985
2	GH 1 Stunde	6070000	5810000	5370000	2875000,00	288905,982
2	GH 12 Stunde		1090000	1070000	540000,00	10000,000
2	GH 1 Tag	908343,63	983857,94	916072,88	468045,74	33923,061
2	GH 3 Tage	214523,17	219686,14	218218,47	108737,96	2172,187
2	GH 1 woche	232033,72	209830,14	255543,8	116234,61	18665,064
2	GH 1 Monat		0	0	0,00	
2	GH 3 Monate		100798,95	122382,76	55795,43	10791,905
3	GH Frisch	16900000,00		16000000	82250000,00	450000,000
3	GH 30 minuten	9830000	8160000		4497500,00	835000,000
3	GH 1 Stunde	12900000	13500000	13700000	6683333,33	339934,634
3	GH 2 Stunden	2450000	2210000	2440000	1183333,33	110855,261
3	GH 4 Stunden	679608,19	624074,69	652484,94	326027,97	22673,486
3	GH 6 Stunden		1630000	1740000	842500,00	55000,000
3	GH 8 Stunden	600343,69	516529		279218,17	41907,345
3	GH 10 Stunden	972124,69	990544,19	963164	487638,81	11398,083
3	GH 12 Stunden		679703,94	669684,88	337347,21	5009,530
3	GH 1 Tag	443406,19	523863,16	550853,69	253020,51	45639,625
3	GH 3 Tage	1370000	1280000	1290000	656666,67	40276,820
3	GH 1 woche		1920000	1760000	920000,00	80000,000
3	GH 1 Monat	1090000	981005	974214,69	507536,62	53053,701
3	GH 3 Monate	0	0	0	0,00	0,000
4	GH Frisch	7230000	7010000	7450000	36150000,00	179629,248
4	GH 30 minuten	2300000	2200000	2270000	11283333,33	41899,350
4	GH 1 Stunde	5520000		4670000	2547500,00	425000,000
4	GH 2 Stunden	979546,81	934154,13		4784252,35	22696,340
4	GH 4 Stunden	717968,75	763219,19		3702969,85	22625,220
4	GH 6 Stunden	553559	628033		2953980,00	37237,000
4	GH 8 Stunden	369791,16	378384,75	352553,03	1834548,23	10740,788
4	GH 10 Stunden		488095,91	451932,25	2350070,40	18081,830

## Anhang

4	GH 12 Stunden	1440000	1560000	1600000	766666,67	67986,927
4	GH 1 Tag	769514,25	888925,94		414610,05	59705,845
4	GH 3 Tage	1990000	2270000	2200000	1076666,67	118977,122
4	GH 1 woche	1020000	860328,44	973762,38	475681,80	67082,191
4	GH 1 Monat		1680000	1610000	822500,00	35000,000
4	GH 3 Monate		123025,55	140705,53	65932,77	8839,990
5	GH Frisch	13000000	14900000	15500000	72333333,33	1065624,491
5	GH 30 minuten	5670000	5770000	5940000	28966666,67	111455,023
5	GH 1 Stunde	6410000	6110000	6300000	3136666,67	123917,535
5	GH 2 Stunden		2800000	2670000	13675000,00	65000,000
5	GH 4 Stunden	2960000	2540000	2760000	13766666,67	171529,071
5	GH 6 Stunden		328181,84	372945,47	1752818,28	22381,815
5	GH 8 Stunden	939226,56	1010000		4873066,40	35386,720
5	GH 10 Stunden	556791,88	665828,44	660482,63	3138504,92	50187,782
5	GH 12 Stunden		577590	460514,91	259526,23	58537,545
5	GH 1 Tag	3910000	3760000	4190000	1976666,67	178200,885
5	GH 3 Tage	1140000	1390000	1360000	648333,33	111455,023
5	GH 1 woche	7080000	6180000	6080000	3223333,33	449691,252
5	GH 1 Monat		912430,56	848654,81	440271,34	31887,875
5	GH 3 Monate	171532,45	161952,11	146165,03	79941,60	10459,025
6	GH Frisch	18200000	17500000	16400000	86833333,33	740870,359
6	GH 30 minuten	12600000	11200000	10500000	57166666,67	873053,390
6	GH 1 Stunde		10100000	11000000	5275000,00	450000,000
6	GH 2 Stunden	2660000	2450000	2420000	12550000,00	106770,783
6	GH 4 Stunden	1510000	1620000	1360000	7483333,33	106562,449
6	GH 6 Stunden	291691,91	321859,63	316087,59	1549398,55	13074,815
6	GH 8 Stunden		336350,41	269127,64	1513695,13	33611,385
6	GH 10 Stunden		489019,66	492793,44	2454532,75	1886,890
6	GH 12 Stunden	4920000	4920000	4840000	2446666,67	37712,362
6	GH 1 Tag	5900000	5420000	5050000	2728333,33	347978,288
6	GH 3 Tage	1100000	919273		504818,25	90363,500
6	GH 1 woche		4330000	5170000	2375000,00	420000,000
6	GH 1 Monat	3230000	3270000	3340000	1640000,00	45460,606
6	GH 3 Monate		41367,66	58519,41	24971,77	8575,875

## Anhang

**Tabelle 38 : Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien Wildtyp mtDNA im Kleinhirngewebe**

Werte (Rohdaten) mit mehr als 20% Abweichung wurde entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
1	KH Frisch	3910000	3160000	3590000	1776666,67	307281,991
1	KH 30 minuten	6890000	5240000		3032500,00	825000,000
1	KH 1 Stunde	5230000	5560000	5510000	2716666,67	145220,139
1	KH 12 Stunde		1830000	1930000	940000,00	50000,000
1	KH 1 Tag	811258,38		884289,56	423886,99	36515,590
1	KH 3 Tage	444176,84	483063,31	479021,88	234377,01	17456,828
1	KH 1 woche	2410000	2540000	3000000	1325000,00	253113,940
1	KH 1 Monat	2650000	2870000	3040000	1426666,67	159652,400
1	KH 3 Monate	239723,11	276506,75	296875,72	135517,60	23651,056
2	KH Frisch		1990000	1660000	912500,00	165000,000
2	KH 30 minuten	3220000	3500000	3580000	1716666,67	154344,492
2	KH 1 Stunde	2070000	2280000	1860000	1035000,00	171464,282
2	KH 12 Stunde	818816,13	944203,94	882032,44	440842,09	51189,951
2	KH 1 Tag	492240,16	423480,13	561395,44	246185,96	56303,767
2	KH 3 Tage	1070000		991638,94	515409,74	39180,530
2	KH 1 woche	1210000	1010000	977564,31	532927,39	102782,631
2	KH 1 Monat	0	0	0	0,00	0,000
2	KH 3 Monate	0	0	0	0,00	0,000
3	KH Frisch		3520000	4380000	1975000,00	351093,530
3	KH 30 minuten		5460000	6550000	3002500,00	444990,637
3	KH 1 Stunde	5890000	6020000	5740000	2941666,67	114406,682
3	KH 2 Stunden	1280000	1530000	1360000	695000,00	104243,305
3	KH 4 Stunden	529863,81	541147,13	601182,63	2786989,28	31301,311
3	KH 6 Stunden	574118,25	514238,53		2720891,95	29939,860
3	KH 8 Stunden	624620,06	572521,75	552068,44	2915350,42	30543,793
3	KH 10 Stunden	673177,06		673860,13	3367592,98	341,535
3	KH 12 Stunden	1540000	1540000		770000,00	0,000
3	KH 1 Tag	1910000	1680000	1870000	910000,00	100332,780
3	KH 3 Tage	928248,81	831769,63	777166,56	422864,17	62463,833
3	KH 1 woche	1250000	1360000	1120000	621666,67	98092,926
3	KH 1 Monat	0	0	0	0,00	0,000
3	KH 3 Monate	0	0	0	0,00	0,000
4	KH Frisch	2500000	2790000	2510000	1300000,00	134412,301
4	KH 30 minuten	3260000	3050000	2770000	1513333,33	200720,923
4	KH 1 Stunde	6820000	6540000	7260000	3436666,67	296348,144
4	KH 2 Stunden	1050000	947879,75		4994699,38	51060,125
4	KH 4 Stunden	908153,5		898188,06	4515853,90	4982,720
4	KH 6 Stunden	929071	848967,5		4445096,25	40051,750
4	KH 8 Stunden	441686,47		571307,63	2532485,25	64810,580
4	KH 10 Stunden	534915,88	563986,25		2747255,33	14535,185

## Anhang

4	KH 12 Stunden	2350000	2030000	2190000	1095000,00	130639,453
4	KH 1 Tag		1000000	1220000	555000,00	110000,000
4	KH 3 Tage	746626,69	665406,25		353008,24	40610,220
4	KH 1 woche	1600000	1550000	1840000	831666,67	126578,917
4	KH 1 Monat	4290000	4240000	4330000	2143333,33	36817,870
4	KH 3 Monate	723957,38	766401,25	766693,56	376175,37	20077,485
5	KH Frisch	9610000	1060000	1130000	19666666,67	4014111,220
5	KH 30 minuten	15600000	14300000	12700000	71000000,00	1186029,792
5	KH 1 Stunde	6660000	6380000	5920000	3160000,00	305068,298
5	KH 2 Stunden		506852,59	536237,81	2607726,00	14692,610
5	KH 4 Stunden	833668,21	91866,55		2313836,90	370900,830
5	KH 6 Stunden	50702,41	48898,29	49186,23	247978,22	791,381
5	KH 8 Stunden	369974,47	319142,94	384527,75	1789408,60	28029,381
5	KH 10 Stunden	169098,36	131244,86	157209,34	762587,60	15805,732
5	KH 12 Stunden	1520000	1430000	1560000	751666,67	54365,021
5	KH 1 Tag	10900000	11400000	13100000	5900000,00	941629,793
5	KH 3 Tage	6050000	5590000		2910000,00	230000,000
5	KH 1 woche	7980000	6990000	6990000	3660000,00	466690,476
5	KH 1 Monat		1890000	2280000	1042500,00	195000,000
5	KH 3 Monate	975164,5	891014,63	1100000	494363,19	85855,167
6	KH Frisch	4590000	4730000	5680000	25000000,00	484217,582
6	KH 30 minuten	12100000	12600000	12800000	62500000,00	294392,029
6	KH 1 Stunde	5500000	560000	5510000	1928333,33	2331098,930
6	KH 2 Stunden	580429,38	647979,5	644261,69	3121117,62	31004,309
6	KH 4 Stunden	175972,23	153513,78		823715,03	11229,225
6	KH 6 Stunden	201263,78	200030,19	184405,22	976165,32	7672,986
6	KH 8 Stunden		106521,77	104959,73	528703,75	781,020
6	KH 10 Stunden	135803,42	121046,03		642123,63	7378,695
6	KH 12 Stunden		988905,69	780017,38	442230,77	104444,155
6	KH 1 Tag	688519,38	699339	685040,19	345483,10	6088,467
6	KH 3 Tage	4490000	4940000	5370000	2466666,67	1278213,452
6	KH 1 woche	3540000	3710000	3160000	1735000,00	755494,687
6	KH 1 Monat	4020000	3500000	3050000	1761666,67	744410,032
6	KH 3 Monate	323200,31	297758,56	278275,09	149872,33	66173,111

## Anhang

**Tabelle 39. Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien mtDNA mit 4977 bp Deletion im Großhirngewebe.** Werte (Rohdaten) die mit über 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
1	GH Frisch	4437,11		4291,85	<b>21822,4</b>	72,630
1	GH 30 minuten	5185,03	4771,05		<b>2489,02</b>	206,990
1	GH 1 Stunde	2667	2452,79	2461,61	<b>1263,56667</b>	98,966
1	GH 12 Stunde	90,04		91,81	<b>45,4625</b>	0,885
1	GH 1 Tag	573,04	468,3	480,24	<b>253,596667</b>	46,815
1	GH 3 Tage		179,52	143,86	<b>80,845</b>	17,830
1	GH 1 woche	16,04	13,29		<b>7,3325</b>	1,375
1	GH 1 Monat	4,99	5,81		<b>2,7</b>	0,410
1	GH 3 Monate	0	0	0	<b>0</b>	0,000
2	GH Frisch	29,98		23,99	<b>134,925</b>	2,995
2	GH 30 minuten	0	0	0	<b>0</b>	0,000
2	GH 1 Stunde	0		0	<b>0</b>	0,000
2	GH 12 Stunde	0	0	0	<b>0</b>	0,000
2	GH 1 Tag	0	0	0	<b>0</b>	0,000
2	GH 3 Tage	0	0	0	<b>0</b>	0,000
2	GH 1 woche	0	0	0	<b>0</b>	0,000
2	GH 1 Monat	0	0	0	<b>0</b>	0,000
2	GH 3 Monate	0	0	0	<b>0</b>	0,000
3	GH Frisch		5633,11	6705,72	<b>30847,075</b>	536,305
3	GH 30 minuten	6039,68	5934,54		<b>2993,555</b>	52,570
3	GH 1 Stunde	760,45	609,77		<b>342,555</b>	75,340
3	GH 2 Stunden	2844,78	2909,06		<b>14384,6</b>	32,140
3	GH 4 Stunden	978,05	923,38	833	<b>4557,38333</b>	59,812
3	GH 6 Stunden	3334,57		2769,11	<b>15259,2</b>	282,730
3	GH 8 Stunden		587,22	488,18	<b>2688,5</b>	49,520
3	GH 10 Stunden	993,57	1139,44	1210,65	<b>5572,76667</b>	90,353
3	GH 12 Stunden	287,38	256,5	201,11	<b>124,165</b>	35,690
3	GH 1 Tag		148,31	144,85	<b>73,29</b>	1,730
3	GH 3 Tage	908,35	773,98	778,79	<b>410,186667</b>	62,240
3	GH 1 woche	825,35		957,29	<b>445,66</b>	65,970
3	GH 1 Monat	562,32		450,27	<b>253,1475</b>	56,025
3	GH 3 Monate	0	0	0	<b>0</b>	0,000
4	GH Frisch	9884,13	8805,05		<b>46722,95</b>	539,540
4	GH 30 minuten	394,18	318,94		<b>1782,8</b>	37,620
4	GH 1 Stunde	11339,54	10972,59		<b>5578,0325</b>	183,475
4	GH 2 Stunden	1290,69	1870,96		<b>7904,125</b>	290,135
4	GH 4 Stunden		482,81	394,24	<b>2192,625</b>	44,285
4	GH 6 Stunden	1067,4	885,42		<b>4882,05</b>	90,990
4	GH 8 Stunden	146,22	176,24		<b>806,15</b>	15,010
4	GH 10 Stunden	593,46	477,04		<b>2676,25</b>	58,210
4	GH 12 Stunden	251,52	206,11		<b>114,4075</b>	22,705

## Anhang

4	GH 1 Tag	260,2	190,05	0	<b>75,0416667</b>	35,075
4	GH 3 Tage		1083,38	873,14	<b>489,13</b>	105,120
4	GH 1 woche	399,61	381,1		<b>195,1775</b>	9,255
4	GH 1 Monat	674,12	581,09		<b>313,8025</b>	46,515
4	GH 3 Monate		14,51	17,54	<b>8,0125</b>	1,515
5	GH Frisch	9487,91	10328,52		<b>49541,075</b>	420,305
5	GH 30 minuten		121,97	126,09	<b>620,15</b>	2,060
5	GH 1 Stunde	2177,37	2621,56	2872,97	<b>1278,65</b>	287,590
5	GH 2 Stunden		4527,31	4489,27	<b>22541,45</b>	19,020
5	GH 4 Stunden	5539,36		4743,88	<b>25708,1</b>	397,740
5	GH 6 Stunden		75,77	60,07	<b>339,6</b>	7,850
5	GH 8 Stunden	576,92	446,46		<b>2558,45</b>	65,230
5	GH 10 Stunden	185,34		226,93	<b>1030,675</b>	20,795
5	GH 12 Stunden	27,14	28,93		<b>14,0175</b>	0,895
5	GH 1 Tag	397	362,99		<b>189,9975</b>	17,005
5	GH 3 Tage		60,69	59,04	<b>29,9325</b>	0,825
5	GH 1 woche	665,97	539,74		<b>301,4275</b>	63,115
5	GH 1 Monat		6,82	8,49	<b>3,8275</b>	0,835
5	GH 3 Monate	1,56	1,25		<b>0,7025</b>	0,155
6	GH Frisch	25759,02	20847,06		<b>116515,2</b>	2455,980
6	GH 30 minuten	3874,79	3108,01		<b>17457</b>	383,390
6	GH 1 Stunde		3863,47	4802,19	<b>2166,415</b>	469,360
6	GH 2 Stunden	3207,81	3316,1	3997,76	<b>17536,1167</b>	349,668
6	GH 4 Stunden	1723,72	2036,14	1672,26	<b>9053,53333</b>	160,784
6	GH 6 Stunden		108,57	113,02	<b>553,975</b>	2,225
6	GH 8 Stunden	251,11	202,96		<b>1135,175</b>	24,075
6	GH 10 Stunden	326,95	350,09		<b>1692,6</b>	11,570
6	GH 12 Stunden	441,02	409,27	449,76	<b>216,675</b>	17,397
6	GH 1 Tag		965,3	871,88	<b>459,295</b>	46,710
6	GH 3 Tage		37,76	34,86	<b>18,155</b>	1,450
6	GH 1 woche		398,36	400,14	<b>199,625</b>	0,890
6	GH 1 Monat		71,4	85,09	<b>39,1225</b>	6,845
6	GH 3 Monate	0	0	0	<b>0</b>	0,000

## Anhang

**Tabelle 40: Mittels RT-qPCR bestimmte Anzahl Kopien mtDNA mit 4977 bp Deletion im Kleinhirngewebe.** Werte (Rohdaten) die mit über 20 % Abweichung wurden entfernt.

Probe	Gewebe	Messung 1 (Kopien / 2 µl)	Messung 2 (Kopien / 2 µl)	Messung 3 (Kopien / 2 µl)	Mittelwert (Kopien / µl)	Standardabweichung (Kopien / µl)
1	KH Frisch	74,85	72,55	76,49	100388,89	1,616
1	KH 30 Minuten		52,33	57,09	19308,33	2,380
1	KH 1 Stunde		62,18	73,71	56708,33	5,765
1	KH 12 Stunde		25,46	31,55	18705,56	3,045
1	KH 1 Tag	17,06		18,96	11562,50	0,950
1	KH 3 Tage	0	0	0	11562,50	0,000
1	KH 1 Woche	0	0	0	5141,67	0,000
1	KH 1 Monat	0	0	0	0,00	0,000
1	KH 3 Monate	0	0	0	43175,00	0,000
2	KH Frisch	0	0	0	5019,44	0,000
2	KH 30 Minuten	0	0	0	86037,50	0,000
2	KH 1 Stunde	0	0	0	59566,67	0,000
2	KH 12 Stunde	0	0	0	24000,00	0,000
2	KH 1 Tag	0	0	0	9250,00	0,000
2	KH 3 Tage	0	0	0	6645,83	0,000
2	KH 1 Woche	0	0	0	44208,33	0,000
2	KH 1 Monat	0	0	0	136861,11	0,000
2	KH 3 Monate	0	0	0	5437,50	0,000
3	KH Frisch		1017,63	1265	229658,33	123,685
3	KH 30 Minuten		1,57	1,62	8500,00	0,025
3	KH 1 Stunde	0	0	0	120741,67	0,000
3	KH 2 Stunden	145,9		151,48	46327,78	2,790
3	KH 4 Stunden	285,08		278,44	11800,00	3,320
3	KH 6 Stunden	210,13	220,16		42136,11	5,015
3	KH 8 Stunden	194,17		181,58	13852,78	6,295
3	KH 10 Stunden	244,8		304,49	11308,33	29,845
3	KH 12 Stunden	266,46	225,24	226,94	5025,00	19,043
3	KH 1 Tag	520,53		469,89	17070,83	25,320
3	KH 3 Tage		93,33	87,97	4583,33	2,680
3	KH 1 Woche	127,29	121,99		4133,33	2,650
3	KH 1 Monat	0	0	0	23333,33	0,000
3	KH 3 Monate	0	0	0	4561,11	0,000
4	KH Frisch	99,48	102,07	120,92	33888,89	9,555
4	KH 30 Minuten	67,03	63,93		317450,00	1,550
4	KH 1 Stunde	596,22		692,91	100245,83	48,345
4	KH 2 Stunden		26,66	29,7	15247,22	1,520
4	KH 4 Stunden	127,07		109,72	17336,11	8,675
4	KH 6 Stunden	119,81		115,04	8533,33	2,385
4	KH 8 Stunden	48,39	41,68		14112,50	3,355
4	KH 10 Stunden	33,09	28,44		59404,17	2,325
4	KH 12 Stunden	1313,9	1640,7		6529,17	163,400

## Anhang

4	KH 1 Tag	59,16	54,23	69,76	20380,56	6,479
4	KH 3 Tage	51,54	47,28		8525,00	2,130
4	KH 1 woche	47,2	57,06		32650,00	4,930
4	KH 1 Monat	113,45		117,57	117970,83	2,060
4	KH 3 Monate		15,25	12,99	33804,17	1,130
5	KH Frisch	278,61		292,82	1257666,67	7,105
5	KH 30 minuten	470,9		382,12	1277277,78	44,390
5	KH 1 Stunde	63,23	56,39		813666,67	3,420
5	KH 2 Stunden		57,62	47,88	37816,67	4,870
5	KH 4 Stunden	4,99	5,72		17722,22	0,365
5	KH 6 Stunden	6	0	0	2627,78	0,000
5	KH 8 Stunden	58,38		47,85	96205,56	5,265
5	KH 10 Stunden	4,38	3,78		19386,11	0,300
5	KH 12 Stunden	2,19		2,15	80402,78	0,020
5	KH 1 Tag	105,31	128,94		103394,44	11,815
5	KH 3 Tage	23,36		27,76	46470,83	2,200
5	KH 1 woche	23,76	17,79	21,93	8291,67	2,497
5	KH 1 Monat	0	0	0	17250,00	0,000
5	KH 3 Monate	0,11		0,13	9852,78	0,010
6	KH Frisch	123,95	99,89		106313,89	12,030
6	KH 30 minuten	13404,25	14115,03	14211,31	965555,56	359,911
6	KH 1 Stunde		628,42	529,18	200638,89	49,620
6	KH 2 Stunden	62,1		54,77	69800,00	3,665
6	KH 4 Stunden	25,82	21,06		13191,67	2,380
6	KH 6 Stunden	18,65	23,14		60575,00	2,245
6	KH 8 Stunden	19,51	23,72		30686,11	2,105
6	KH 10 Stunden		82,68	79,44	10777,78	1,620
6	KH 12 Stunden	110,83	97,27		49913,89	6,780
6	KH 1 Tag	25,71	26,65		17575,00	0,470
6	KH 3 Tage	194,32	232,77		211344,44	19,225
6	KH 1 woche	81,79	79,73		145187,50	1,030
6	KH 1 Monat		21,74	20,07	60220,83	0,835
6	KH 3 Monate				129405,56	1,616

## 10 Literaturverzeichnis

- Adler CP., Böcking A., Christ B., Costabel U., Denk H., Drexler H., Freudenberg N., Herbst EW., Höpker WW., Klöppel G., Krekeler GR., and Müller H., 1993: *"Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Auflage"*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P., 2005: *"Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 3. Auflage"*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P., 2004: *"Molecular Biology of the Cell, 4. Auflage"*. Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH Verlag.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., and Jaenicke L., 2004: *"Molekularbiologie der Zelle"*.
- Ananian V. T. P, PE, ND, RD, CL., 2010: *"Tumoural specimens for forensic puposes: comparison of genetic alterations in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues"*. International Journal for Legal Medicine.
- Anderson S., Bankier A. T., Borel B. G., de Bruijn MHL., Coulson AR., Drouin J., Eperon IC., Nierlich DP., Roe BA., Sanger F., Schreier PH., Smith AJH., Staden R., and Young IG., 1981: *"Sequence and organization of the human mitochondrial genome"*. Nature, pp.457-65.
- Applied Biosystems, 2005: *"Absolute Quantification Getting Started Guide"*.
- Arnheim N., Cortopassi G., 1992: *"Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissue"*. Mutation Research, pp.157-67.
- Ashburner, 1970: *"Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. V. Responses to environmental treatments"*. Chromosoma, pp.356-76.
- Auer RN., 2000: *"Pure Hypoxic and ischemic Brain insults"*. In Oehmichen M., Saternus KS. Research in Legal Medicine, Vol. 24 : Brain Hypoxia and Ischemia. Lübeck: Schmidt-Römhild. pp.27-39.
- Bai R. K., Wong L. J., 2005: *"Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease."* Journal of Molecular Diagnostics, pp.613-22.

- Barja G., 2000: "*The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging*". Aging 12 85), pp.342-55.
- Becker T. SJaSE., 2005: "*Chaperone Systems in Chloroplasts.Vol.5*". In Buchner J., Kiefhaber T., eds. Protein Folding Handbook. 1. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp.1047-92.
- Becker, Craig, 1994: "*Heat-shock proteins as molecular chaperons*". European Journal of Biochemistry, pp.11-23.
- Berneburg M., Gattermann N., Stege H., Grewe M., Vogelsang K., Ruzicka T., and Krutmann J., 1997: "*Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system.*" Photochemistry and Photobiology, pp.271-5.
- Berntman L., Carlsson., and Siesjö BK., 1979: "*Cerebral oxygen consumption and blood flow in hypoxia: influence of sympathoadrenal activation.*" Stroke, pp.20-25.
- Biogazelle.com, 2010-2011: "*Biogazelle - Accelerating your analysis*". [Online] Biogazelle Available at: [http://www.biogazelle.com/files/ImportFileGuidelines/Import\\_file\\_guidelines\\_7500\\_SDS13\\_14.pdf](http://www.biogazelle.com/files/ImportFileGuidelines/Import_file_guidelines_7500_SDS13_14.pdf) [Accessed 16 May 2011].
- Birbaumer N. S. R., 2006: "*Biologische Psychologie, 6. Auflage*". Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Block T. M., 2006: "*Differentielle Expression von  $\alpha$ -Aktinin Isoformen im Myokard von Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie*". Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Blum H., Beier H., and Gross H. J., 1987: "*Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*". Electrophoresis, pp.93-99.
- Boonjaraspinyo S., Boonmars T., Kaewkes S., Laummaunwai P., Pinlaor S., and Bhudhisawasdi V., 2011: "*Down-Regulated Expression of HSP70 in Correlation with Clinicopathology of Cholangiocarcinoma*". Pathol Oncol Res, p.epub.
- Borchiellini C., Boury-Esnault N., Vacelet J., and Parco Y. L., 1998: "*Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi.*" Molecular Biology and Evolution, pp.647-55.

## Anhang

Bouthoorn S., van der Ploeg T., van Erkel N., and van der Lely N., 2010: *"Alcohol Intoxication Among Dutch Adolescents: Acute Medical Complications in the Years 2000-2010"*. Clinical Pediatrics, pp.244-51.

Brandon M., 2009: *"MitoMap"*. [Online] Available at: <http://mitomap.org/MITOMAP> [Accessed 01 June 2011].

Brocchieri L., Conway de Macario E., and Macario A. J., 2008: *"hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions"*. BioMed Central Evolutionary Biology.

Brocchieri L., Macario E. Cd., and Macario AJ., 2008: *"hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions"*. BMC Evolutionary Biology, pp.1-20.

Bukau B., Weissman J., and Horwich A., 2006: *"Molecular chaperones and protein quality control"*. Cell, pp.443-51.

Bundesamt für Statistik, 2012: *"<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html>"*. [Online] [Accessed 26 März 2012].

Bundesregierung, 2011: *"[https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/dateien/Publikationen/Drogen\\_Sucht/Broschueren/Drogen\\_und\\_Suchtbericht\\_2011\\_110517\\_Drogenbeauftragte.pdf](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/dateien/Publikationen/Drogen_Sucht/Broschueren/Drogen_und_Suchtbericht_2011_110517_Drogenbeauftragte.pdf)"*. [Online] [Accessed 11 December 2011].

Burel, Mezger, Pinto, Rallu, Trigon, and Morange, 1992: *"Mammalian heat shock protein families. Expression and functions."* Experientia, pp.629-34.

Burkschat M., Cramer E., and Kamps U., 2002: *"Beschreibende Statistik: Grundlegende Methoden"*. Berlin: Springer Verlag.

Butler J. M., 2011: *"Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology, 3. Auflage"*. Academic Press.

Calabrese V., Guagliano E., Sapienza M., Panebianco M., Calafato S., Puleo E., Pennisi G., Mancuso C., Butterfield D. A., and Stella A. G., 2007: *"Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes."* Neurochemical Research, pp.757-73.

- Calabrese V., Scapagnini G., Catalano C., Bates TE., Geraci D., Pennisi G., and Giuffrida Stella AM., 2001: "*Regulation of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress: role of vitamin E.*" International journal of tissue reactions, pp.127-35.
- Calabrese V., Scapagnini G., Ravagna A., Giuffrida Stella A. M., and Butterfield D. A., 2002: "*Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation.*" Developmental Neuroscience, pp.1-13.
- Calabrese V., Stella A., Butterfield D., and Scapagnini G., 2004: "*Redox Regulation in Neurodegeneration and Longevity: Role of the Heme Oxygenase and HSP70 Systems in Brain Stress Tolerance*". Antioxidants & Redox Signaling, pp.895-913.
- Calderwood S. K., Ciocca D. R., 2008: "*Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer.*" International Journal of Hyperthermia, pp.31-39.
- Cardullo RA., Agrawal S., Flores C., Zamaneczik PC., and Wolf DE., 1988: "*Detection of nucleic acid hybridization by nonradioactive fluorescence resonance energy transfer.*" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, pp.8790-94.
- Cardullo RA., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P. C., and Wolf DE., 1988: "*Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.*" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp.8790-8794.
- Chan HM., Zhu L., Zhong R., and Grant D., 1993: "*Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats*". Toxicology and Applied Pharmacology, pp.89-96.
- Chen B., Jia T., Zhang B., and Kang L., 2011: "*Evolution of Hsp70 Gene Expression: A Role for Changes in AT-Richness within Promoters*". Plosone.
- Cherian MG., Shaikh ZA., 1975: "*Metabolism of intravenously injected cadmium-binding protein.*" Biochemical and Biophysical Research Communications, pp.863-869.
- Corral-Debrinski M., Horton T., Lott M., Shoffner J., Flint Beal M., and Wallace D., 1992: "*Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age*". Nature Genetics Vol. 2, pp.324-29.
- Cortopassi G. A., Shibata D., Soong N. W., and Arnheim N., 1992: "*A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues.*" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp.7370-7374.
- Crott J., Choi S., Branda R., and Mason J., 2005: "*Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue und folate-dependent in rats*". Mutation research 570, pp.63-70.

## Anhang

- Daugaard M., Rohde M., and Jäättelä M., 2007: *"The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions"*. FEBS Letters 581, pp.3702-01.
- Di Domenico F., Sultana R., Tiu G., Scheff N., Perlugi M., Cini C., and Butterfield D., 2010: *"Protein Levels of Heat Shock Proteins 27, 32, 60, 70, 90 and Thioredoxin-1 in Amnesic Mild Cognitive Impairment: An Investigation on the Role of Cellular Stress Response in the progression of Alzheimer Disease"*. Brain Res., pp.72-81.
- Dittmar M., Knuth M., Beineke M., and Epe B., 2008: *"Role of oxidative DNA damage and antioxidative enzymatic defence systems in human aging."* The Open Anthropology Journal 1, pp.38-45.
- Dudley R. E., Gammal L. M., and Klaassen C. D., 1985: *"Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity."* Toxicology and Applied Pharmacology, pp.414-26.
- Dworniczak B., Mirault M. E., 1987: *"Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'congnate' protein."* Nucleic Acids Research, pp.5181-97.
- Faes G., 2011: *"Basis Statistik"*. [Online] Available at: <http://www.faes.de/Basis/Basis-Statistik/basis-statistik.html> [Accessed 30 Mai 2011].
- Faller A., Schünke M., 1995: *"Der Körper des Menschen"*. Stuttgart: Thieme.
- Faller A., Schünke M., and Schünke G., 2008: *"Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion, 15. Auflage"*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Farrugia A., Keyser C., and Ludes B., 2010: *"Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue"*. Forensic Science International, pp.25-28.
- Feige U., Polla B., 1994: *"Heat shock proteins: the hsp70 family"*. Experientia 50, pp.979-86.
- Feige, Polla, 1994: *"Hsp70-a multi-gene, multi-structure, multifunction"*. Experientia.
- Ferrer I., Armstrong J., Capellari S., Parchi P., Arzberger T., Bell J., Budka H., and Ströbel T., 2007: *"Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study."* Brain Pathology, pp.297-303.
- Feuerlein W., 1989: *"Zur Epidemiologie des Alkoholismus"*. In Schied HW., ed. Der chronische Alkoholoismus. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. Ch. 1. pp.3-14.
- Flanagan S. W., Ryan A. J., Gisolfi C. V., and Moseley P. L., 1995: *"Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress."* American Journal of Physiology, pp.R28-32.

- Foulkes EC., 1978: "*Renal tubular transport of cadmium-metallothionein*". Toxicology and Applied Pharmacology, pp.505-12.
- Fowler C. B., Cunningham R. E., O'Leary T. J., and Mason J. T., 2007: "*Tissue surrogates' as a model for archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues*." Laboratory Investigation, pp.836-46.
- Fracasso T., Heinrich M., Hohoff C., Brinkmann B., and Pfeiffer H., 2009: "*Ultrasound-accelerated formalin fixation improves the preservation of nucleic acids extraction in histological sections*". International Journal of Legal Medicine.
- Fuke S., Kametani M., and Kato T., 2008: "*Quantitative analysis of the 4977-bp common deletion of mitochondrial DNA in postmortem frontal cortex from patients with bipolar disorder and schizophrenia*." Neuroscience Letters - Elsevier, pp.173-77.
- Geller H. M., Cheng K. Y., Goldsmith N. K., Romero A. A., Zhang A. L., Morris E. J., and Grandison L., 2001: "*Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside*." Journal of Neurochemistry, pp.265-75.
- Georgopolous, Welch, 1993: "*Role of the major heat shock proteins as molecular*". Annual Review of Cell and Developmental Biology, pp.601-34.
- Gilbert M. T., Haselkorn T., Bunce M., Sanchez J. J., Lucas S. B., Jewell L. D., Van Marck E., and Worobey M., 2007: "*The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?*" PLoS ONE.
- Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., and Wallace D. C., 1980: "*Maternal inheritance of human mitochondrial DNA*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp.6715-6719.
- Günther E., Walter L., 1994: "*Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates*". Experientia 50, pp.987-1000.
- Gupta RS., Singh B., 1994: "*Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus*." Current Biology, pp.1104-14.
- Harmann D., 1983: "*Free radical theory of aging. Consequences of mitochondrial aging*". Age: 6, pp.86-94.
- Hartl FU., 1996: "*Molecular chaperones in cellular protein folding*." Nature, pp.571-79.
- Holland PM., Abramson RD., Watson R., and Gelfand DH., 1991: "*Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus*

*aquaticus* DNA polymerase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp.7276-80.

Hou JH., Wei YH., 1996: "The unusual structures of the hot regions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA". Biochemical Journal, pp.1065-70.

Hunt C., Morimoto RI., 1985: "Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70." Proceedings of the National Academy of Sciences, pp.6455-6459.

Hutchison C. A., Newbold J. E., Potter S. S., and Edgell M. H., 1974: "Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA". Nature, pp.251 (5475); 536-538.

Ikeda K., Monden T., Kanoh T., Tsujie M., Izawa H., Haba A., Ohnishi T., Sekimoto M., Tomita N., Shiozaki H., and Monden M., 1998: "Extraction and analysis of diagnostically useful proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections." Journal of Histochemistry and Cytochemistry, pp.397-403.

Innis Mea., 1988: "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, pp.9436-40.

Jäättelä M., Wissing D., Bauer PA., and Li GC., 1992: "Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity." The EMBO Journal, pp.3507-12.

Jackson D., Lewis F., Taylor G., Boylston A., and Quirke P., 1990: "Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction". Journal of Clinical Pathology, pp.499-504.

Jelkmann W., 2000: "Physiologische Möglichkeiten und Grenzen der Wärmeabwehr". In Oehmichen M., ed. Hyperthermie, Brand und Kohlenmonoxid, Rechtsmedizinische Forschungsergebnisse. Lübeck: Schmidt-Römhild Verlag. pp.63-78.

Jin X., Wang R., Xiao C., Cheng L., Wang F., Yang L., Feng T., Chen M., Chen S., and Fu X., 2004: "Serum and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: a study in the normal Chinese population." Cell Stress and Chaperones, pp.69-75.

Johnson C., 2009: "Oxidativer Stress". CFS aktuell, April. p.Epub.

Johnston RN., Kucey BL., 1988: "Competitive inhibition of hsp70 gene expression causes thermosensitivity". Science, pp.1551-4.

Jolesch A., Elmer K., Issels R., and Noessner E., 2011: "Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system". European Journal of Cell Biology.

- Jonak C., Klosner G., and Trautinger F., 2009: "*Significance of heat shock proteins in the skin upon UV exposure.*" *Frontiers in Bioscience*, pp.4758-68.
- Kadenbach B., Münscher C., Frank V., Müller-Höcker J., and Napiwotzki J., 1995: "*Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA.*" *Mutation Research*, pp.161-172.
- Kägi JH., Schäffer A., 1988: "*Biochemistry of metallothionein.*" *Biochemistry*, pp.8509-15.
- Kampinga H. H., Hagemann J., Vos M. J., Kubota H., Tanguay R. M., Bruford E. A., Cheetham M. E., Chen B., and Hightower L. E., 2009: "*Guidelines for the nomenclature of the human heat shock protein.*" *Cell Stress and Chaperones*, pp.105-11.
- Kampinga, Hagemann, Vos, Kubota, Tanguay, Bruford, Cheetham, Chen, and Hightower, 2009: "*Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins.*" *Cell Stress Chaperones*, pp.105-11.
- Kapp DS., Lord PF., 1983: "*Thermal tolerance to whole body hyperthermia.*" *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, pp.917-21.
- Kelly S., Yenari M. A., 2002: "*Neuroprotection: heat shock proteins.*" *Current Medical Research and Opinion*, pp.55-60.
- Kempken F., Kempken R., 2006: "*Gentechnik bei Pflanzen: Chancen und Risiken, 3. Auflage.*" Berlin: Springer Verlag.
- Kirkegaard T., Roth A. G., Petersen N. H., Mahalka A. K., Olsen O. D., Moilanen I., Zylicz A., Knudsen J., Sandhoff K., Arenz C., Kinnunen P. K., Nylandsted J., and Jäättelä M., 2010: "*Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology.*" *Nature*, pp.549-553.
- Kleizen, Braakman., 2004: "*Protein folding and quality control in the endoplasmic.*" *Current Opinion in Cell Biology*.
- Köhler W., Schachtel G., and Voleske P., April 2007: "*Biostatistik: Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler.*" 4th ed. Berlin: Springer.
- Krause M., Rodrigues J., 2011: "*Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment.*" *Medical Hypotheses*, pp.286-90.
- Kroll J., Becker K. F., Kuphal S., Hein R., Hofstädter F., and Bosserhoff A. K., 2008: "*Isolation of high quality protein samples from punches of formalin fixed and paraffin embedded tissue blocks.*" *Histology and Histopathology*, pp.391-95.

## Anhang

- Kwon SB., Young C., Kim DS., Choi HO., Kim HK., Chung JH., Eun HC., Park KC., Oh CK., and Seo JS., 2002: "*Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation.*" *Journal of Dermatological Science*, pp.144-151.
- Laemmli U. K., 1970: "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*" *Nature*, pp.680-85.
- Laios E., Rebeyka IM., and Prody CA., 1997: "*Characterization of cold-induced heat-shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes.*" *Molecular and Cellular Biochemistry*, pp.153-59.
- Landry J., Bernier D., Chrétien P., Nicole LM., Tanguay RM., and Marceau N., 1982: "*Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance.*" *Cancer Research*, pp.2457-2461.
- Lang G., 2006: "*Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.*" Wien New York: Springer.
- Laplante A. F., Moulin V., Auger FA., Landry J., Li H., Morrow G., Tanguay RM., and Germain L., 1998: "*Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing.*" *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, pp.1291-301.
- Lee H. C., Pang C. Y., Hsu H. S., and Wei Y. H., 1994: "*Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing.*" *Biochimica et Biophysica Acta*, pp.37-43.
- Lee HC., Pang CY., Hsu HS., and Wei YH., 1994: "*Differential accumulations of 4977 bp deletions in mitochondrial DNA of various tissues in human aging.*" *Biochemica et Biophysica Acta*, pp.37-43.
- Lee K. P., Raez L. E., and Podack E. R., 2006: "*Heat shock protein-based cancer vaccines.*" *Hematology / Oncology Clinics of North America*, pp.637-659.
- Legrand B., Mazancourt P., Durigon M., Khalifat V., and Crainic K., 2002: "*DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues.*" *Forensic Science International*, pp.205-11.
- Lerch S., 2001: "*Untersuchung der antigenen Proteinfractionen eines Sarcoptes-Milben-Extraktes durch SDS-PAGE, Immunoblot, Zweidimensionale Gelelektrophorese und Sequenzanalyse.*" Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin. Freien Universität Berlin.

- Lewin G., Popov I., 1994: *"The Antioxidant System of the Organism. Theoretical basis and Practical Consequences."* Medical Hypotheses, pp.269-75.
- Li C. T., Li L., and Liu Y., 2006: *"Relationship between human age and mtDNA 4977 deletions in human blood cells"*. Fa yi xue za zhi, pp.346-8.
- Li GC., Li LG., Liu YK., Mak JY., Chen LL., and Lee WM., 1991: *"Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene."* Proceedings of the National Academy of Sciences, pp.1681-5.
- Li GC., Li L., Liu RY., Rehman M., and Lee WM., 1992: *"Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain."* Proceedings of the National Academy of Sciences, pp.2036-40.
- Li GC., Meyer JL., Mak JY., and Hahn GM., 1983: *"Heat-induced protection of mice against thermal death"*. Cancer Research, pp.5758-60.
- Lindquist S., 1986: *"The Heat-Shock Response"*. Annual review of biochemistry, pp.1151-91.
- Lindquist, Craig, 1988: *"The Heat-Shock proteins"*. Annual review of biochemistry, pp.631-77.
- Liu H., Yang Y., Tan S., and Liu Y., 2011: *"Positive association of pro-inflammatory biomarkers and increased oxidative stress in the healthy elderly"*. Archives of Gerontology and Geriatrics, 05 Juli. p.5.
- Liu V. W., Zhang C., and Nagley P., 1998: *"Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing."* Nucleic Acids Research, pp.1268-75.
- Livak K. J., Flood SJ., Marmaro J., Giusti W., and Deetz K., 1995: *"Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization."* PCR Methods and Applications, pp.357-62.
- Livak K., Flood S., Marmaro J., Giustu W., and Deetz K., 1995: *"Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product an nucleic acid hybridization"*. PCR Methods an Applications 4, pp.357-62.
- Li GC., Werb Z., 1982: *"Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts"*. Proceedings of the National Academy of Sciences, pp.3218-22.
- Locke M., 2000: *"Heat shock transcription factor activation and hsp72 accumulation in aged skeletal muscle."* Cell Stress and Chaperones, pp.45-51.

- Locke M., Tanguay R. M., 1996: "*Diminished heat shock response in the aged myocardium.*" Cell Stress and Chaperones, pp.251-60.
- Lodish H., Darnell J., and Baltimore D., 1986: "*Molecular Cell Biology*". New York: Scientific American Books.
- Longmire J., et. al, 1988: "*Isolation and Molecular Characterization of a Highly Polymorphic Centromeric Tandem Repeat in the Family Falconidae*". Genomics, pp.14-24.
- Lüllmann H., Mohr K., and Hein L., 2011: "*Pocket Atlas of Pharmacology, 4. Auflage*". Stuttgart, New York: Thieme.
- Lutz S., Weisser H. J., Heizmann J., and Pollak S., 2000: "*Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals.*" International Journal of Legal Medicine, pp.155-61.
- Lutz S., Wittig H., Weisser H.J., Heizmann J., Junge A., Dimo-Simon N., Parson W., Edelmann J., Anslinger K., Jung S., and Augustin C., 2000: "*It is possible to differentiate mtDNA by means of HV III in samples that cannot be distinguished by sequencing the HV I and HV II regions?*" Forensic Science International, pp.97-101.
- Lynes M., 2010: "*Immunomodulation by Endogenous Stress Response Proteins*". Comprehensive Toxicology (Second Edition), pp.549-66.
- Macario A. J., Conway de Macario E., 2005: "*Sick chaperones, cellular stress, and disease.*" The New England Journal of Medicine, pp.1489-501.
- Macario A. J., Conway de Macario E., 2007: "*Molecular chaperones: multiple functions, pathologies, and potential applications.*" Frontiers in Bioscience, pp.2588-600.
- Madea B., 2003: "*Praxis Rechtsmedizin*". Berlin, Heidelberg: Springer verlag.
- Madea B., Dettmeyer R., and Mußhoff F., 2007: "*Basiswissen Rechtsmedizin*". Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Madea B., Dettmeyer R., and Mußhoff F., 2007: "*Basiswissen Rechtsmedizin*". Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Madigan M. T., Martinko J. M., and Parker J., 2002: "*Brock Mikrobiologie*". 1st ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mayer M., Burkau B., 2005: "*Cellular and molecular life science Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*". Cellular and Molecular Life Science, pp.670-84.
- McAlister L., Strausberg S., Kulaga A., and Finkelstein D., 1979: "*Altered Patterns of Protein Synthesis Induced by Heat Shock of Yeast*". Current Genetics, pp.63-74.

- McKENZIE, HENIKOFF, and MEELSON, 1975: "*Localization of RNA from Heat-Induced Polysomes at Puff Sites in*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp.1117-21.
- McMurtry AL., Cho K., Young LJ., Nelson CF., and Greenhalgh DG., 1999: "*Expression of HSP70 in healing wounds of diabetic and nondiabetic mice.*" Journal of Surgical Research, pp.36-41.
- McPherson RW., Zeger S., and Traystman RJ., 1986: "*Relationship of somatosensory evoked potentials and cerebral oxygen consumption during hypoxic hypoxia in dogs.*" Stroke, pp.30-36.
- Meissner C., Mohamed S., von Wurmb N., and Oehmichen M., 2001: "*The mitochondrial genome and aging*". Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie 34, pp.447-51.
- Meissner C., v. Wurmb N., and Oehmichen M., 1997: "*Detection of the age-dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA*". Institute for Legal Medicine, pp.288-91.
- Meissner C., von Wurmb N., Schimansky B., and Oehmichen M., 1999: "*Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle.*" Forensic Science International, pp.115-24.
- Milarski K. L., Morimoto R. I., 1986: "*Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle.*" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp.9517-21.
- Milner C. M., Campbell R. D., 1990: "*Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes.*" Immunogenetics, pp.242-251.
- Miquel J., 1992: "*An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging.*" Mutation Research, pp.209-216.
- Modrow E., 2002: "*Informatik mit Delphi, Band 1*". Scheden: emu-online.
- Modrow E., 2003: "*Informatik mit Delphi, Band 2*". Scheden: emu-online.
- Modrow E., 2004: "*Theoretische Informatik mit Delphi*". Scheden: emu-online.
- Modrow JH., 2011: "*Expression von HSP70 und Alterationen der mitochondrialen DNA im menschlichen Gehirn als Biomarker in der forensischen Diagnostik*". Diplomarbeit. Christian Albrechts Universität zu Kiel.
- Modrow JH., Preusse-Prange A., Meyer P. C., Harder M., Schwark T., and von Wurmb-Schwark N., noch nicht veröffentlicht: "*Highly reliable quantification of proteins such as*

*members of the HSP70 superfamily based on the grey scale index via immune detection stained bands on a Western Blot.*" Forensic Science International. eingereicht März 2012.

Morris S. D., 2002: "*Heat shock proteins and the skin*". Clinical and Experimental Dermatology, pp.220-24.

Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Meriin A. B., Sherman M. Y., Morimoto R. I., and Massie B., 2000: "*The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis.*" Molecular and Cellular Biology, pp.7146-59.

Mülhardt C., 2009: "*Der Experimentator - Molekularbiologie / Genomics, 6. Auflage*". Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Mülhardt C., 2009: "*Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics, 6. Auflage*". Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Mungai P. W. G,JA,PM,DD,BM,SP., 2011: "*Hypoxia triggers AMPK activation through ROS-mediated activation of CRAC channels*". MCB.

Munk K., 2000: "*Grundstudium Biologie - Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution*". Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag.

Munk K., 2000: "*Grundstudium Biologie - Genetik*". Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag.

Munk K., Abröhl C., Kurth T., Langer T., Nethe - Jaenchen R., Schlatter H., Schultze B., and Wolf K., 2008: "*Taschenlehrbuch Biochemie; Biochemie, Zellbiologie*". Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Munro S., Pelham HR., 1987: "*A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins.*" Cell, pp.899-907.

Nádasi A. M. B,L,K., 2003: "*Mitochondrial DNA4977 deletion in brain of newborns died after intensive care*". Acta Biologica Hungarica, pp.253-62.

Nollen E. A., Brunsting J. F., Roelofsen H., Weber L. A., and Kampinga H. H., 1999: "*In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance.*" Molecular and Cellular Biology, pp.2069-2079.

Nover L., 1990 (Teil 2): "*Molekulare Zellbiologie der Hitzestressantwort II.*" Naturwissenschaften, pp.359-365.

Nover, 1990, Teil 1: "*Molekulare Zellbiologie der Hitzestressantwort, Teil I. Naturwissenschaften*". In Teil I. Naturwissenschaften. pp.310-16.

## Anhang

- Pelham HR., 1984: "*Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock.*" The EMBO Journal, pp.3095-100.
- Press W. H., Flannery B. P., Teukolsky S. A., and Vetterling W. T., 1989: "*Numerical Recipes in Pascal - The Art of Scientific Computing*". Cambridge: Cambridge University Press.
- Preuss J., Dettmeyer R., Poster S., Lignitz E., and Madea B., 2008: "*The expression of heat shock protein 70 in kidneys in cases of death due to hypothermia*". Forensic Science International, pp.248-52.
- Preuss J., Dettmeyer R., Poster S., Lignitz E., and Madea B., 2008: "*The expression of heat shock protein 70 in kidneys in cases of death due to hypothermia.*" Forensic Science International, pp.248-53.
- Preusse-Prange A., Modrow JH., Schwark T., and von Wurmb-Schwark N., noch nicht veröffentlicht: "*The problem of protein analysis from formalin fixed tissue*". Forensic Science International. wird eingereicht im April 2012.
- Proctor C., Lorimer I., 2011: "*Modelling the role of the hsp70/hsp90 system in the maintenance of protein homeostasis.*" PloS One, p.e22038.
- Promega, 2006: "*ProtoBlot(R) II AP System with stabilized Substrate*". January.
- Radosavljević T., Mladenović D., and Vucević D., 2009: "*The role of oxidative stress in alcoholic liver injury*". Med. Pregl. 62, pp.547-53.
- Rehm H., Letzel T., 2010: "*Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics; 6. Auflage*". Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Rensing L., 2007: "*Die Grenzen der Lebensdauer*". Biologie unserer Zeit, March. pp.190-99.
- Reynier P., Malthiery Y., 1995: "*Accumulation of deletions in MtDNA during tissue aging: analysis by long PCR.*" Biochemical and Biophysical Research Communications, pp.59-67.
- Riabowol KT., Mizzen LA., and Welch WJ., 1988: "*Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70*". Science, pp.433-6.
- Richter-Landsberg, Goldbaum, and Stahnke, 2006: "*Gehirnzellen im Stress*". Oldenburg: Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
- Ritossa F., 1962: "*A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila*". Eperentia 18, pp.571-73.
- Roitt I. M., 1993: "*Leitfaden der Immunologie, 4. Auflage*". Translated by Zink C. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH.

## Anhang

- Romero A. A., Gross S. R., Cheng K. Y., Goldsmith N. K., and Geller H. M., 2003: *"An age-related increase in resistance to DNA damage-induced apoptotic cell death is associated with development of DNA repair mechanisms."* Journal of Neurochemistry, pp.1275-87.
- Röpke M., 2008: *"Mitochondriale DNA Mutagenese im Cerebellum von Alkoholkranken"*. Diplomarbeit. Christian Albrechts Universität zu Kiel.
- Roth C. F., 2009: *"Gebrauchsanweisung der Roti®-PVDF Membran"*.
- Satoh M., Kuroiwa T., 1991: *"Organization of multiple nucleotids and DNA molecules in mitochondria of human cell"*. Experimental Cell Research, pp.137-40.
- Savioz A., Blouin J. L., Guidi S., Antonarakis S. E., and Bouras C., 1997: *"A method for the extraction of genomic DNA from human brain tissue fixed and stored in formalin for many years."* Acta Neuropathologica, pp.408-13.
- Schiebler TH., Schmidt W., 1987: *"Anatomie, 4. Auflage"*. Berlin: Springer-Verlag.
- Schmitt E., Gehrman M., Brunet M., Multhoff G., and Garrido C., 2007: *"Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy."* Journal of Leukocyte Biology, pp.15-27.
- Schneider F., Frister H., 2002: *"Alkohol und Schuldfähigkeit"*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Schütt A., 2008: *"Frühposttraumatische Expression von Hitzeschockproteinen und Induktion von mitochondrialen Mutationen bei Patienten mit Schädelhirntrauma"*. Diplomarbeit. Christian Albrechts Universität zu Kiel.
- Schwark T., Meissner C., v. Wurmb N., and Oehmichen M., 1998: *"Akkumulation der 4977 bp Deletion in verschiedenen Gehirnabschnitten"*. Rechtsmedizin.
- Schwegler J., Lucius R., 2011: *"Der Mensch, Anatomie und Physiologie, 5. Auflage"*. Stuttgart: Thieme.
- Shaikh ZA., Smith JC., 1976: *"The biosynthesis of metallothionein rat liver and kidney after administration of cadmium"*. Chemico-Biological Interactions, pp.327-36.
- Shaikh ZA., Smith JC., 1977: *"The mechanisms of hepatic and renal metallothionein biosynthesis in cadmium-exposed rats"*. Chemico-Biological Interactions, pp.161-71.
- Shaiks ZA., Lucis OJ., 1972: *"Cadmium and zinc binding in mammalian liver and kidneys"*. Archives of Environmental Health, pp.419-25.

- Shenkar R., Navidi W., Tavaré S., Dang MH., Chomyn A., Attardi G., Cortopassi G., and Arnheim N., 1996: *"The mutations rate of the human mtDNA deletion mtDNA 4977"*. American Journal of Human Genetics, pp.772-80.
- Shi S. R., Key M. E., and Kalra K. L., 1991: *"Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections."* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, pp.741-48.
- Simonetti S., Chen X., DiMauro S., and Schon EA., 1992: *"Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR"*. Biochemica et Biophysica Acta, pp.113-22.
- Singh R., Kolvraa S., and Rattan S. I., 2007: *"Genetics of human longevity with emphasis on the relevance of HSP70 as candidate genes."* Frontiers in Bioscience, pp.4504-13.
- Sobotta J., Ferner H., and Staubesand J., 1982: *"Atlas der Anatomie des Menschen I, 18. Auflage"*. München; Wien; Baltimore: Kastner & Callwey.
- Song SY., Okeda R., Funata N., and Higashino F., 1983: *"An experimental study of the pathogenesis of the selective lesion of the globus pallidus in acute carbon monoxide poisoning in cats. With special reference to the chronologic change in the cerebral local blood flow."* Acta Neuropathologica, pp.232-38.
- Soong N. W., Hinton D. R., Cortopassi G., and Arnheim N., 1992: *"Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain."* Nature Genetics, pp.318-323.
- Squibb KS., Ridlington JW., Carmichael NG., and Fowler BA., 1979: *"Early cellular effects of circulating cadmium-thionein on kidney proximal tubules"*. Environmental Health Perspectives, pp.287-96.
- Stein KH., Flenker H., 1998: *"Basiswissen Histologie und Zytologie, 2. Auflage"*. Frankfurt am Main: Umschau Zeitschriften Verlag, Breidenstein GmbH.
- Storm T., Rath S., Mohamed S. A., Bruse P., Kowald A., Oehmichen M., and Meissner C., 2002: *"Mitotic brain cells are just as prone to mitochondrial deletions as neurons: a large-scale single-cell PCR study of the human caudate nucleus."* pp.1389-1400.
- Storm T., Rath S., Mohamed S. A., Bruse P., Kowald A., Oehmichen M., and Meissner C., 2002: *"Mitotic brain cells are just as prone to mitochondrial deletions as neurons: a large-scale single-cell PCR study of the human caudate nucleus."* Experimental Gerontology, pp.1387-400.

- Strachan T., Read A. P., 2005: *"Molekulare Humangenetik, 3. Auflage"*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Taira T., Narita T., Iguchi-Arigo S. M., and Ariga H., 1997: *"A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene."* Nucleic Acids Research, pp.1975-83.
- Takamiya M., Biwasaka H., Saigusa K., Nakayashiki N., and Aoki Y., 2009: *"Wound age estimation by simultaneous detection of 9 cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay: an estimative method using outsourced examinations."* Legal medicine (Tokyo, Japan), pp.186-90.
- Takamiya M., Fujita S., Saigusa K., and Aoki Y., 2008: *"Simultaneous detection of eight cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay for wound age estimation."* International Journal of Legal Medicine, pp.143-48.
- Tavaria, Gabriele, Kola, and Anderson, 1996: *"A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family"*. Cell Stress Chaperones, pp.23-28.
- Terao Y., Miyamoto S., Hirai K., Kamiguchi H., Ohta H., Shimojo M., Kiyato Y., Asahi S., Sakura Y., and Shintani Y., 2009: *"Hypothermia enhances heat-shock protein 70 production in ischemic brains"*. Neuroreport, pp.745-49.
- Tirapelli D. P., Carlotti Jr C. G., Leite J. P., Tirapelli L. F., and Colli B. O., 2010: *"Expression of HSP70 in cerebral ischemia and neuroprotective action of hypothermia and ketoprofen."* Arquivos de Neuro-Psiquiatria, pp.592-596.
- Tissières, Mitchell, and Tracy, 1974: *"Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs."* Journal of molecular biology, pp.389-98.
- Toescu EC., Myronova N., and Verkhatsky, 2000: *"Age-related structural and functional changes of brain mitochondria"*. Cell Calcium, pp.1-10.
- Torrenteguy C., Frasson A., Zerwes F., Winnikov E., da Silva V. D., Ménoret A., and Bonorino C., 2006: *"Inducible heat shock protein 70 expression as a potential predictive marker of metastasis in breast tumors."* Cell Stress and Chaperones, pp.34-43.
- Totan S., Echo A., and Yuksel E., 2011: *"Heat shock proteins modulate keloid formation"*. eplasty, pp.190-202.
- Trepel M., 2008: *"Neuroanatomie, Struktur und Funktion, 4. Auflage"*. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.

- Tveita A. A., Dietrichs E. S., and Tveita T., 2012: *"Myocardial gene expression profiling of rewarming shock in a rodent model of accidental hypothermia."* Cryobiology Journal, p.Available online 31 January 2012.
- Voet D., Voet J. G., and Pratt C. W., 2010: *"Lehrbuch der Biochemie, 2. Auflage, Deutsche Übersetzung"*. Translated by Häcker B., Asperger O., von Eggelkraut - Gottanka R., Koglin N. et al. Weinheim: Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- von Wurmb N., Oehmichen M., and Meissner C., 1998: *"Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood"*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, pp.247-54.
- von Wurmb-Schwark N., Higuchi R., Fenech A., Elfstroem C., Meissner C., and Oehmichen M., 2002: *"Quantification of human mitochondrial DNA in real time PCR"*. Forensic Science International:126 (1), pp.34-39.
- von Wurmb-Schwark N., Higuchi R., Fenech A. P., Elfstroem C., Meissner C., Oehmichen M., and Cortopassi G. A., 2002: *"Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR."* Forensic Science International, pp.34-39.
- von Wurmb-Schwark N., Ringleb A., Schwark T., Broese T., Weirich S., Schlaefke D., Wegener R., and Oehmichen M., 2008: *"The effect of chronic alcohol consumption on mitochondrial DNA mutagenesis in human blood."* Mutation Research, pp.73-79.
- von Wurmb-Schwark N., Schwark T., Caliebe A., Drenske C., Nikolaus S., Schreiber S., and Nebel A., 2010: *"Low level of the mtDNA(4977) deletion in blood of exceptionally old individuals."* Mechanisms of Ageing and Development, pp.179-84.
- von Wurmb-Schwark N., Schwark T., Meissner C., and Oehmichen M., 2003: *"Mitochondrial mutagenesis in the brain in forensic and pathological research"*. Legal Medicine: 5, pp.1-6.
- Voos, Rottgers., 2002: *"Molecular chaperones as essential mediators of"*. Biochimica et Biophysica Acta.
- Wallace DC., Shoffner JM., Trounce I., Brown MD., Ballinger SW., Corral-Debrinski M., Horton T., Jun AS., and Lott MT., 1995: *"Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging"*. Biochemica et Biophysica Acta, pp.141-51.
- Wang J., Lü Y., 2009: *"Mitochondrial DNA 4977-bp deletion correlated with reactive oxygen species production and manganese superoxidizedismutase expression in gastric tumor cells"*. Chinese Medical Journal, pp.431-36.

- Webb M., Cain K., 1982: "*Functions of metallothionein*". Biochemical Pharmacology, pp.137-42.
- Welch WJ., 1993: "*How cells respond to stress*". Scientific American, pp.56-64.
- Welch W. J., Feramisco J. R., 1984: "*Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells.*" The Journal of Biological Chemistry, pp.4501-13.
- Werner M., Chott A., Fabiano A., and Battifora H., 2000: "*Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry.*" The American Journal of Surgical Pathology, pp.1016-19.
- WHO, 2012: "<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#>". [Online] [Accessed 25 Februar 2012].
- Wijdicks EF., Parisi JE., and Sharbrough FW., 1994: "*Prognostic value of myoclonus status in comatose survivors of cardiac arrest.*" Annals of Neurology, pp.239-243.
- Wittwer CT., Herrmann MG., Moss AA., and Rasmussen RP., 1997: "*Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*". Biotechniques, pp.130-38.
- Wolf D., 2011: "*Delphi Praxis*". [Online] Available at: <http://www.delphi Praxis.net/> [Accessed 01.-08. 2011].
- Wu B., Hunt C., and Morimoto R., 1985: "*Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70*". Molecular and Cellular Biology, pp.330-341.
- Xia X. Y., Xia Y. X., 2011: "*Effects of graded hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat.*" Chinese Medical Science Journal, pp.49-53.
- Yang J. H., Lee H. C., Lin K. J., and Wei Y. H., 1994: "*A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin.*" Archives of Dermatological Research, pp.386-390.
- Young JC. VRAKSaFUH., 2004: "*Pathways of chaperone-mediated*". Nature Reviews Molecular Cell Biology.
- Zhang J., Piantadosi CA., 1992: "*Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain.*" Journal of Clinical Investigation, pp.1193-1199.
- Zimmermann J., Hajibabaei M., Blackburn DC., Hanken J., Cantin E., Posfai J., and Evans TC., 2008: "*DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assesment*". Frontiers in Zoology.

# 11 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

## 11.1 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE IN DIESER ARBEIT UNTERSUCHTEN STRESSPROTEINE.	6
TABELLE 2: KLASSIFIZIERUNG DER ALKOHOLERKRANKUNG BERUHEND AUF DER EINTEILUNG DER WHO. DIE EINTEILUNG ERFOLGT ANHAND DER ICD10 IN AKUTE ALKOHOLISIERUNG, SCHÄDLICHEN GEBRAUCH UND ALKOHOLABHÄNGIGKEIT. UM DIE DIAGNOSE ALKOHOLABHÄNGIGKEIT ZU STELLEN MÜSSEN MINDESTENS DREI DER KRITERIEN GLEICHZEITIG, WÄHREND DES LETZTEN JAHRES AUFGETRETEN SEIN (SCHNEIDER ET AL., 2002, WHO 2012).	21
TABELLE 3: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DER HSPA8-KONZANTRATION BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER GROßHIRNRINDE. DIE KONZENTRATION WURDE MIT DER MEMBRALYZER SOFTWARE BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 52 GRAPHISCH DARGESTELLT.	92
TABELLE 4: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DER HSPA1A-KONZANTRATION BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER GROßHIRNRINDE. DIE KONZENTRATIONEN WURDEN MIT DER MEMBRALYZER SOFTWARE BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 53 GRAPHISCH DARGESTELLT.	93
TABELLE 5: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DER MTDNA-KOPIEN / ZELLE BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER GROßHIRNRINDE. DIE KONZENTRATIONEN WURDEN MITTELS RTQ-PCR BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 54 GRAPHISCH DARGESTELLT.	95
TABELLE 6: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER GROßHIRNRINDE. DIE KONZENTRATIONEN WURDEN MITTELS RTQ-PCR BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 55 GRAPHISCH DARGESTELLT.	97
TABELLE 7 TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DER HSPA8-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER KLEINHIRNRINDE. DIE KONZENTRATION WURDE MIT DER MEMBRALYZER SOFTWARE BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 56 GRAPHISCH DARGESTELLT.	99
TABELLE 8 TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DER HSPA1A-KONZENTRATION BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER KLEINHIRNRINDE. DIE KONZENTRATIONEN WURDEN MIT DER MEMBRALYZER SOFTWARE BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 57 GRAPHISCH DARGESTELLT.	101
TABELLE 9: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DER MTDNA-KOPIEN / ZELLE BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER KLEINHIRNRINDE. DIE KONZENTRATIONEN WURDEN MITTELS RTQ-PCR BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 58 GRAPHISCH DARGESTELLT.	103

## Anhang

TABELLE 10: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSEERGEBNISSE DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> BEI VERSCHIEDENEN TODESURSACHEN. ANGEGEBEN SIND DIE ZEHN HÖCHSTEN MESSWERTE IN DER KLEINHIRNRINDE. DIE KONZENTRATIONEN WURDEN MITTELS RTQ-PCR BESTIMMT. ZUSÄTZLICH SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN UND DAS GESCHLECHT ANGEGEBEN. DIE MESSWERTE SIND IN ABB. 59 GRAPHISCH DARGESTELLT.	105
TABELLE 11: PIPETTIERSCHEMA FÜR ZWEI 9,5CM X 9,5CM GELE.	133
TABELLE 12: PROBENDATEN. AUFGEFÜHRT SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN, DAS GESCHLECHT UND DIE TODESURSACHE.	142
TABELLE 13: DIE BERECHNETEN WERTE DES MANN-WHITNEY-U TESTS. MIT HILFE DES MANN-WHITNEY-U TESTS LÄSST SICH EINE HYPOTHESENENTSCHEIDUNG TREFFEN. HIERZU WIRD DER P-WERT ERRECHNET, DAS HEIßT, OB DIE NULLHYPOTHESE ANGENOMMEN ODER ABGELEHNT WERDEN KANN. ES WERDEN ZWEI HYPOTHESEN AUFGESTELLT: EINE NULLHYPOTHESE (FRAGESTELLUNG) UND EINE ALTERNATIVHYPOTHESE (VERNEINUNG DER FRAGESTELLUNG).	145
TABELLE 14: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM GROßHIRNGEWEBE (RINDE). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	147
TABELLE 15: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM KLEINHIRNGEWEBE (RINDE). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	149
TABELLE 16 : MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM GROßHIRNGEWEBE (MARK). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	151
TABELLE 17: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM KLEINHIRNGEWEBE (MARK). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	153
TABELLE 18:: BESTIMMUNG DER GESSAMTPROTEINKONZENTARTION ( $\mu\text{G} / \mu\text{L}$ ) IN DER GROßHIRN- UND KLEINHIRNRINDE. MIT ANGABE DER UMRECHUNG IN $\mu\text{G} / \mu\text{L}$ .	156
TABELLE 19: BESTIMMUNG DER GESSAMTPROTEINKONZENTARTION ( $\mu\text{G} / \mu\text{L}$ ) IM MARK DES GROß- UND KLEINHIRNS. MIT ANGABE DER UMRECHUNG IN $\mu\text{G} / \mu\text{L}$ .	159
TABELLE 20: MIT DER SOFTWARE MEMBRALYZER© BESTIMMTE STRESSPROTEIN KONZENTRATION IM KLEINHIRNGEWEBE UND GROßHIRN (RINDE).	162
TABELLE 21: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM GROßHIRNGEWEBE (RINDE). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	165
TABELLE 22: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM KLEINHIRNGEWEBE (RINDE). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	168
TABELLE 23: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM GROßHIRNGEWEBE (MARK). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	171
TABELLE 24 : MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM KLEINHIRNGEWEBE (MARK). WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	174
TABELLE 25: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN WILDTPY MTDNA IM GROßHIRNGEWEBE	177
TABELLE 26: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN WILDTPY MTDNA IM KLEINHIRNGEWEBE	179
TABELLE 27: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN WILDTPY MTDNA IM GROßHIRNGEWEBE	182
TABELLE 28: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN WILDTPY MTDNA IM KLEINHIRNGEWEBE	185
TABELLE 29: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN MTDNA MIT 4977 BP DELETION IM	188

## Anhang

TABELLE 30: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN MTDNA MIT 4977 BP DELETION IM	191
TABELLE 31: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN MTDNA MIT 4977 BP DELETION IM	194
TABELLE 32: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN MTDNA MIT 4977 BP DELETION IM	197
TABELLE 33: PROBENDATEN. AUFGEFÜHRT SIND DAS ALTER DER VERSTORBENEN, DAS GESCHLECHT UND DIE TODESURSACHE.	200
TABELLE 34: GESAMTPROTEINKONZENTRATION. ANGEBEN SIND ALLE DREI MESSUNGEN UND DIE STANDARDABWEICHUNG.	200
TABELLE 35: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM GROßHIRNGEWEBE. WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	204
TABELLE 36: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE MENGE NUKLEÄRER DNA IM KLEINHIRNGEWEBE. WERTE MIT MEHR ALS 20 % ABWEICHUNG WURDEN ENTFERNT.	206
TABELLE 37: : MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN WILDTYPE MTDNA IM GROßHIRNGEWEBE	208
TABELLE 38 : MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN WILDTYPE MTDNA IM KLEINHIRNGEWEBE	210
TABELLE 39. MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN MTDNA MIT 4977 BP DELETION IM	212
TABELLE 40: MITTELS RT-QPCR BESTIMMTE ANZAHL KOPIEN MTDNA MIT 4977 BP DELETION IM	214

## 11.2 Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> DARSTELLUNG DER PROTEINSTRUKTUREN AM BEISPIEL DES HÄMOGLOBINS.	2
<b>ABBILDUNG 2:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG MÖGLICHER AUSLÖSER DER ZELLULÄREN STRESSANTWORT (EIGENE ILLUSTRATION).	5
<b>ABBILDUNG 3:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES KLEINHIRNS NACH DUUS.	12
<b>ABBILDUNG 4:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LA-ENGLIEDERUNG DES GROßHIRNS.	13
<b>ABBILDUNG 5:</b> DAS MITOCHONDRIALE GENOM DES MENSCHEN.	16
<b>ABBILDUNG 6:</b> FLUSSDIAGRAMM DER PROBENBEARBEITUNG.	30
<b>ABBILDUNG 7:</b> DARSTELLUNG DER GEMESSENEN WERTE FÜR DIE STANDARDKURVE.	34
<b>ABBILDUNG 8:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER GELKAMMER FÜR DIE SDS-PAGE (EIGENE DARSTELLUNG).	35
<b>ABBILDUNG 9:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES MENSCHLICHEN IMMUNGLOBULINS DER KLASSE G.	41
<b>ABBILDUNG 10:</b> IMMUNDETEKTION DER MEMBRANGEBUNDENEN PROTEINE.	43
<b>ABBILDUNG 11:</b> MEMBRAN NACH DER FÄRBUNG MIT AMIDOSCHWARZ.	44
<b>ABBILDUNG 12:</b> QUANTIFIZIERUNG DER SIGNALE AUF DER MEMBRAN MIT HILFE DER MEMBRALYZER SOFTWARE 2.5.1.	45
<b>ABBILDUNG 13:</b> SCHEMA DER ABC – METHODE (EIGENE DARSTELLUNG).	49
<b>ABBILDUNG 14:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER RTQ-PCR (MODROW, 2011).	51
<b>ABBILDUNG 15:</b> VERGLEICH DER AUSGETESTETEN EXTRAKTIONSMETHODEN.	55
<b>ABBILDUNG 16:</b> VERGLEICH VON ZWEI SDS-KONZENTRATIONEN IM EXTRAKTIONSPUFFER.	56
<b>ABBILDUNG 17:</b> FOTO EINER PROTEINVERDÜNNUNGSREIHE NACH COOMASSI-FÄRBUNG.	57

## Anhang

<b>ABBILDUNG 18:</b> FOTO EINER PROTEINVERDÜNNUNGSREIHE NACH SILBERFÄRBUNG.	58
<b>ABBILDUNG 19:</b> FOTO EINER PROTEINVERDÜNNUNGSREIHE NACH WESTERN BLOT.	59
<b>ABBILDUNG 20: ABHÄNGIGKEIT DER GESAMTPROTEINKONZENTRATION VON DER FORMALININKUBATIONSZEIT.</b>	61
<b>ABBILDUNG 21:</b> ANTEIL VON HSPA8 UND HSPA1A AN DER GESAMTPROTEINKONZENTRATION IN %.	62
<b>ABBILDUNG 22:</b> MITTELWERTE DER VISUELLEN BEURTEILUNG DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE.	63
<b>ABBILDUNG 23:</b> MITTELWERTE DER VISUELLEN BEURTEILUNG DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE.	63
<b>ABBILDUNG 24:</b> IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON HSPA8 UND HSPA1A IN ABHÄNGIGKEIT VON VERSCHIEDENEN FORMALININFIXIERUNGSZEITEN.	64
<b>ABBILDUNG 25:</b> IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON HSPA8 UND HSPA1A IN ABHÄNGIGKEIT VON VERSCHIEDENEN FORMALININFIXIERUNGSZEITEN.	64
<b>ABBILDUNG 26:</b> ABHÄNGIGKEIT DER NDNA-KONZENTRATION VON DER FORMALININKUBATIONSZEIT.	65
<b>ABBILDUNG 27:</b> ABHÄNGIGKEIT DER MTDNA-KOPIEN PRO ZELLE VON DER FORMALININKUBATIONSZEIT.	66
<b>ABBILDUNG 28:</b> ABHÄNGIGKEIT DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> VON DER FORMALININKUBATIONSZEIT.	67
<b>ABBILDUNG 29:</b> VERGLEICH DER NDNA-KONZENTRATION IM RINDEN- UND MARK-BEREICH DES GROß- UND KLEINHIRNS.	69
<b>ABBILDUNG 30:</b> GESCHLECHTSSPEZIFISCHER VERGLEICH DER NDNA-KONZENTRATION IM RINDEN- UND MARK-BEREICH DES GROß- UND KLEINHIRNS.	70
<b>ABBILDUNG 31:</b> VERGLEICH DER NUKLEÄREN DNA-KONZENTRATION MIT DEM ERREICHTEN LEBENSALTER.	71
<b>ABBILDUNG 32:</b> VERGLEICH DER NUKLEÄREN DNA-KONZENTRATION MIT DEM ERREICHTEN LEBENSALTER.	71
<b>ABBILDUNG 33:</b> VERGLEICH DER ANZAHL AN MTDNA-KOPIEN / ZELLE IM RINDEN UND MARK-BEREICH DES GROß- UND KLEINHIRNS.	73
<b>ABBILDUNG 34:</b> GESCHLECHTSSPEZIFISCHER VERGLEICH DES RINDEN- UND MARK-BEREICHS IM GROß- UND KLEINHIRN.	74
<b>ABBILDUNG 35:</b> ABHÄNGIGKEIT DER MTDNA-KOPIEN IN DER GROßHIRNRINDE ZUM LEBENSALTER.	75
<b>ABBILDUNG 36:</b> ABHÄNGIGKEIT DER MTDNA-KOPIEN IN DER KLEINHIRNRINDE ZUM LEBENSALTER.	76
<b>ABBILDUNG 37:</b> ABHÄNGIGKEIT DER MTDNA-KOPIEN IM MARK DES GROßHIRNS ZUM LEBENSALTER.	77
<b>ABBILDUNG 38:</b> ABHÄNGIGKEIT DER MTDNA-KOPIEN IM MARK DES KLEINHIRNS ZUM LEBENSALTER.	78
<b>ABBILDUNG 39:</b> DELETIONSANTEILE IN VERSCHIEDENEN GEHIRNBEREICHEN.	79
<b>ABBILDUNG 40:</b> VERGLEICH DES PROZENTUALEN ANTEILS DER DMTDNA <sup>4977</sup> IM RINDEN- UND MARK-BEREICH DES GROß- UND KLEINHIRNS.	80
<b>ABBILDUNG 41:</b> GESCHLECHTSSPEZIFISCHER VERGLEICH DES RINDEN- UND MARK-BEREICHS IM GROß- UND KLEINHIRN.	81
<b>ABBILDUNG 42:</b> ABHÄNGIGKEIT DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> IN DER GROßHIRNRINDE ZUM LEBENSALTER	82
<b>ABBILDUNG 43:</b> ABHÄNGIGKEIT DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> IN DER KLEINHIRNRINDE ZUM LEBENSALTER.	82

## Anhang

<b>ABBILDUNG 44:</b> ABHÄNGIGKEIT DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> IM MARK DES GROßHIRNS ZUM LEBENSALTER.	83
<b>ABBILDUNG 45:</b> ABHÄNGIGKEIT DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> IM MARK DES KLEINHIRNS ZUM LEBENSALTER.	84
<b>ABBILDUNG 46:</b> GESCHLECHTSSPEZIFISCHE VERTEILUNG DER HSPA8-PROTEINMENGE IM GROßHIRN UND KLEINHIRN.	86
<b>ABBILDUNG 47:</b> VERTEILUNG DER HSPA8-PROTEINMENGE IM GROßHIRN IN ABHÄNGIGKEIT ZUM, LEBENSALTER.	86
<b>ABBILDUNG 48:</b> VERTEILUNG DER HSPA8-PROTEINMENGE IM KLEINHIRN IN ABHÄNGIGKEIT ZUM LEBENSALTER.	87
<b>ABBILDUNG 49:</b> GESCHLECHTSSPEZIFISCHE VERTEILUNG DER HSPA1A-PROTEINMENGE IM GROßHIRN UND KLEINHIRN.	88
<b>ABBILDUNG 50:</b> VERTEILUNG DER HSPA1A-PROTEINMENGE IM GROßHIRN IN ABHÄNGIGKEIT ZUM LEBENSALTER.	89
<b>ABBILDUNG 51:</b> VERTEILUNG DER HSPA1A-PROTEINMENGE IM KLEINHIRN IN ABHÄNGIGKEIT ZUM LEBENSALTER.	90
<b>ABBILDUNG 52:</b> ABHÄNGIGKEIT UNTERSCHIEDLICHER TODESURSACHEN ZUR HSPA8-KONZENTRATION.	91
<b>ABBILDUNG 53:</b> ABHÄNGIGKEIT UNTERSCHIEDLICHER TODESURSACHEN ZUR HSPA1A-KONZENTRATION.	93
<b>ABBILDUNG 54:</b> ABHÄNGIGKEIT UNTERSCHIEDLICHER TODESURSACHEN ZUR MTDNA KOPIEN / ZELLE.	94
<b>ABBILDUNG 55:</b> ABHÄNGIGKEIT UNTERSCHIEDLICHER TODESURSACHEN DES PROZENTUALEN ANTEILS AN DMTDNA <sup>4977</sup> .	96
<b>ABBILDUNG 56:</b> ABHÄNGIGKEIT UNTERSCHIEDLICHER TODESURSACHEN ZUR HSPA8-KONZENTRATION.	98
<b>ABBILDUNG 57:</b> ABHÄNGIGKEIT DER HSPA1A-KONZENTRATION VON UNTERSCHIEDLICHEN TODESURSACHEN.	100
<b>ABBILDUNG 58:</b> ABHÄNGIGKEIT DER ANZAHL AN MTDNA KOPIEN / ZELLE VON UNTERSCHIEDLICHER TODESURSACHEN.	102
<b>ABBILDUNG 59:</b> ABHÄNGIGKEIT DES PROZENTUALEN ANTEILS DER DMTDNA <sup>4977</sup> VON UNTERSCHIEDLICHEN TODESURSACHEN.	104

## 12 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Frau PD. Dr. rer. nat. Nicole von Wurmb-Schwark, Institut für Rechtsmedizin Kiel,  
meiner Doktormutter

für die lehrreichen Jahre, sowie für die Hilfe und Unterstützung bei der  
Umsetzung dieser Dissertation.

Herrn Dr. med. Dr. jur. Hans-Jürgen Kaatsch, Institut für Rechtsmedizin Kiel

für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin Kiel  
erstellen zu können.

dem Evangelischen Studienwerk Villigst e.V.;

für ihre finanzielle und ideelle Förderung, sowie die Möglichkeit das eigene  
interdisziplinäre Wissen stets zu erweitern.

Herrn Dr. med Thorsten Schwark, Institut für Rechtsmedizin Kiel

für seinen Rat bei rechtsmedizinischen Fragen.

Frau Dipl. Biol. Melanie Harder, Herrn Dipl. Biol. Patrick Meyer, Herrn Dr. rer. nat.

Ben Krause-Kyora und Frau Dr. rer. nat. Heinrich, meinen ehemaligen Laborkollegen

für die Unterstützung, die schöne Zeit in und außerhalb des Instituts, sowie  
die hilfreichen Gesprächen im Laboralltag.

Herrn Dipl. Biol. Jan-Hendrik Modrow, Institut für Rechtsmedizin Kiel

für seine unendliche Geduld und Unterstützung, wenn mein Computer mal  
wieder nicht so wollte wie ich.

allen anderen Mitarbeitern des Institutes der Rechtsmedizin Kiel

für die nette Zusammenarbeit und die schönen Jahre.

Frau PD. Dr. rer. nat. Alexa Klettner; Klinik für Ophthalmologie Kiel

für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Proteinanalytik.

Frau Prof. Dr. med. Renate Lüllmann-Rauch, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius

und Frau Dagmar Niemeier, Anatomisches Instituts der CAU Kiel

für die Möglichkeit, das Fotomikroskop des Instituts nutzen zu können.

Frau Ursula Prange, meiner Mutter

für die finanzielle Unterstützung, die mir mein Studium ermöglicht hat und

für ihre Hilfe meinem Weg stets zu begleiten, egal wie verschlungen er  
manchmal auch war.

Frau Dr. des. Katja Bethke-Prange M.A., meiner Schwester

für Ihre Unterstützung diese Dissertation auf den rechten Weg zubringen.

Herrn Carsten Preuße, meinem Ehemann

für sein Verständnis, seine Geduld und seinen festen Glauben an mich.

## 13 Lebenslauf

Name:	Andrea Preuße-Prange geb. Prange
Geburtsdatum:	12.August 1976
Geburtsort:	Kiel
Anschrift:	Herderstrasse 7 D - 24116 Kiel
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch
weitere Ausbildung	
Juni 2008 -	Beginn der Promotion Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Juni 2008 - Mai 2011	Promotionsstipendiatin des Begabtenförderungswerks der evangelischen Kirchen (Evangelisches Studienwerk Villigst e.V.)
2001 - 2007	Biologiestudium Christian-Albrechts-Universität zu Kiel <i>Diplom</i> Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Mikrobiologie und Rechtsmedizin
1997 - 2000	Ausbildung zur Medizinisch-Technischen Laboratoriumsassistentin Staatlich anerkannte Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin am Institut für Hygiene und Umweltmedizin im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
1996 – 1997	Freiwilliges soziales Jahr integrative Kindertagesstätte der Diakonie in Kiel-Suchsdorf
Schulausbildung	
1993 –1996	Besuch der Käthe-Kollwitz-Schule, Kiel <i>Abitur</i>
1987 –1993	Besuch der Realschule im Bildungszentrum Mettenhof, Kiel <i>Realschulabschluss</i>
1983 – 1987	Besuch der Ganztagsgrundschule am Göteborgring, Kiel

## 14 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Andrea Preuße-Prange geb.. Prange, geboren am 12.08.1976 in Kiel, dass diese Abhandlung nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Beiträge von anderen als meiner Person wurden deutlich als solche hervorgehoben.

Diese Arbeit wurde weder im Ganzen noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens zur Begutachtung vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurden bei der Entstehung dieser Arbeit eingehalten.

Kiel den 03.04.2012

-----  
Andrea Preuße-Prange