

**Aus dem Institut für Rechtsmedizin
(Direktor Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**MITOCHONDRIALE DNA-MUTAGENESE BEI HIV-
INFIZIERTEN SCHWANGEREN UND DEREN KINDER
UNTER AZIDOTHYIMIDIN (AZT)-PROPHYLAXE**

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

**vorgelegt von
ANGELA KATERNA
aus Nürnberg
Kiel 2013**

1. Berichtstatter: Prof. Dr. von Wurmb-Schwark

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Dr. Schünke

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 03.02.2014

gezeichnet: Prof. Dr. Roider

Gliederung

1. Einleitung

- 1.1 Mitochondrien
 - 1.1.1 Humane mitochondriale DNA
 - 1.1.2 Mitochondriale Mutagenese
 - 1.1.3 Die 4977 bp common deletion
- 1.2 Quantifizierung der 4977 bp common deletion
 - 1.2.1 absolute Quantifizierung mittels Realtime-PCR
 - 1.2.2 relative Quantifizierung mittels Duplex-PCR
- 1.3 Plazenta und Nabelschnur
 - 1.3.1 Funktion
 - 1.3.2 Anatomie
- 1.4 Zidovudin
 - 1.4.1 Zidovudin in der Anwendung bei HIV
 - 1.4.2 Schädigungen durch Zidovudin
- 1.5 Humanes Immundefizienz-Virus
 - 1.5.1 Epidemiologie
 - 1.5.2 HIV und Schwangerschaft

2. Zielsetzung

3. Material und Methoden

- 3.1 Probenmaterial
- 3.2 DNA-Extraktion
 - 3.2.1 Vorversuche zur DNA-Extraktion
 - 3.2.2 Extraktion aus Plazenta und Nabelschnur
- 3.3 absolute Quantifizierung mittels Realtime-PCR
 - 3.3.1 Singleplex-Realtime-PCR zur Quantifizierung von nDNA
 - 3.3.2 Duplex-Realtime-PCR zur Quantifizierung von absoluter und spezifischer 4977 bp deletierter mtDNA
- 3.4 relative Quantifizierung mittels Duplex-PCR
 - 3.4.1 Duplex-PCR
 - 3.4.2 relative Quantifizierung mit Hilfe des ABI Prism® Genetic Analyzer

3.5 Powerplex-PCR zur Individualisierung

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche zur DNA-Extraktion

4.1.1 Plazenta

4.1.2 Nabelschnur

4.2 Überprüfung der Probenqualität und –quantität mittels Gelelektrophorese

4.2.1 Probenqualität

4.2.2 Probenquantität

4.3 absolute Quantifizierung mittels Realtime-PCR

4.3.1 Singleplex-Realtime-PCR

4.3.2 Duplex-Realtime-PCR

4.4 relative Quantifizierung mittels Duplex-PCR

4.5 Nachweis polymorpher STRs

4.6 Zellzahl und mtDNA-Gehalt

4.6.1 Zellzahl pro μl in Nabelschnur und Plazenta

4.6.2 Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle in Nabelschnur und Plazenta

4.6.3 Behandlungsgruppe

4.6.3.1 Zellzahl pro μl in Nabelschnur und Plazenta

4.6.3.2 Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle in Nabelschnur und Plazenta

4.6.4 Kontrollgruppe

4.6.4.1 Zellzahl pro μl in Nabelschnur und Plazenta

4.6.4.2 Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle in Nabelschnur und Plazenta

4.7 Die 4977bp-Deletion der mtDNA bei HIV-infizierten Schwangeren mit und ohne AZT-Therapie

4.7.3 Die 4977 bp Deletion in der Behandlungsgruppe

4.7.4 Die 4977 bp Deletion in der Kontrollgruppe

4.7.5 Die 4977 bp Deletion in Plazenta und Nabelschnur

5. Diskussion

5.1 Probenauswahl

- 5.2 Probenaufbewahrung und Transport
 - 5.3 DNA-Extraktion
 - 5.4 Quantifizierung der nukleären sowie der gesamten und spezifisch deletierten mtDNA
 - 5.4.1 absolute Quantifizierung der nukleären DNA
 - 5.4.2 absolute und relative Quantifizierung der mitochondrialen DNA und der 4977 bp Deletion
 - 5.5 Gibt es einen Unterschied im Plazentagewebe von HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und von HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese?
 - 5.6 Gibt es einen Unterschied im Plazentagewebe von HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und von HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese?
 - 5.7 Gibt es einen Unterschied im Nabelschnurgewebe von HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und von HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese?
 - 5.8 Auswirkung von AZT und HIV auf die mitochondriale DNA-Mutagenese
6. Zusammenfassung
7. Anhang
- 7.1 Geräte und Reagenzien nach art der Anwendung
 - 7.2 PCR-Ansätze und Profile
 - 7.2.1 Realtime-PCR
 - 7.2.1.1. nukleäre Realtime-PCR
 - 7.2.1.2. mtDNA Realtime-PCR
 - 7.2.2 Duplex-PCR
 - 7.2.3 Powerplex-PCR
 - 7.3 Ergebnisse
 - 7.4 Abkürzungen

8. Literatur

9. Danksagung

10. Selbstständigkeitserklärung

11. Lebenslauf

1. EINLEITUNG

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind durch die oxidative Energiegewinnung die wichtigsten Energielieferanten für alle aerob lebenden Zellen. Sie stammen von frei lebenden aeroben Eubakterien (alpha-Proteobakterien) ab, die vor ungefähr 1,5 Milliarden Jahren von einer anaeroben Ur-Eukaryotenzelle aufgenommen wurden. Sie haben sich im Laufe der Zeit zu einem semiautonomen Organell eukaryotischer Zellen entwickelt. Dieser Vorgang wird auch als Endosymbiontentheorie bezeichnet. Heute sind sie für die β -Oxidation von Fettsäuren, die Transaminierung von Aminosäuren und einem Teil des Harnstoffzyklus verantwortlich. Die wichtigste Bedeutung erlangen sie durch die Atmungskette und die ATP-Synthase mit deren Hilfe sie einen Großteil des benötigten ATPs der Zelle produzieren. Dieser Vorgang wird oxidative Phosphorylierung genannt bei dem die vollständige Oxidation von Zuckern und Fetten mit molekularem Sauerstoff zu Kohlendioxid und Wasser stattfindet (Alberts et al., 2003).

Mitochondrien sind bemerkenswert bewegliche und plastische Organelle, die ständig ihre Form ändern, die rund, lang gestreckt oder auch verzweigt sein kann. Sie kommen im Cytosol aller eukaryotischen Zellen vor, haben einen Durchmesser von 0,5 bis 1 μm und sind ungefähr 4 μm lang. Das Mitochondrium ist durch zwei hoch spezialisierte Membranen, eine innere ionen-impermeable und eine äußere ionen-permeable, in zwei Kompartimente geteilt (Abb.1).

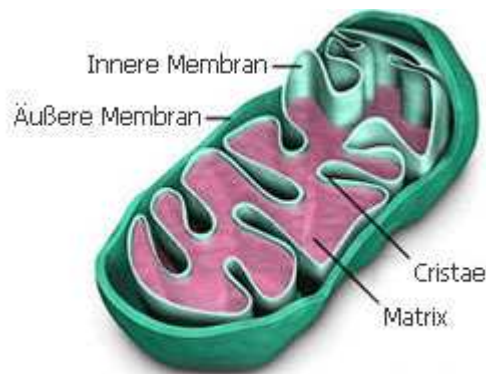


Abbildung 1: Das Mitochondrium (schematische Darstellung). Das Mitochondrium besitzt zwei verschiedene Membranen, welche es in zwei Kompartimente unterteilen, die Matrix und der Intermembranraum. Die innere Membran enthält vielfache Einfaltungen, die als Cristae bezeichnet werden (Internet: zytologie-online.net, 2010).

Die Außenmembran enthält viele Transportproteine, die für Moleküle von einer Größe bis zu 5.000 Dalton und weniger durchlässig ist. In der Innenmembran findet die Hauptarbeit der Mitochondrien statt. Sie enthält zahlreiche Einfaltungen die sogenannten Cristae. Eingebettet in die innere Membran sind die Elektronentransportkette sowie die ATP-Synthase, die für die ATP-Gewinnung essentiell sind. Durch die Membranen wird das Mitochondrium in zwei Kompartimente unterteilt, die Matrix und den Intermembranraum. In der Matrix befindet sich die mitochondriale DNA (mtDNA), zahlreiche Enzyme des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels sowie ein eigener Translations- und Transkriptionsapparat (Alberts et al., 2003). Die Mitochondrienzahl verschiedener Gewebe ist genauso variabel wie ihre Form und ist abhängig von deren Energiebedarf. Sie kann von nur wenigen bis hin zu mehreren tausend in einer Zelle reichen. Lymphozyten enthalten beispielsweise etwa 1.000, Spermien bis zu 100 und in Eizellen können bis zu 100.000 Mitochondrien pro Zelle vorkommen (Strachan & Read, 2005; Taanman, 1999).

1.1.1 humane mitochondriale DNA

Das mitochondriale Genom des Menschen umfasst 16.569 Basenpaare (bp) und kodiert für 22 tRNA-Gene, zwei rRNA-Gene und 13 Gene, die für Enzyme der Atmungskette kodieren (Abb.2).

Die komplette Sequenz wurde 1981 von Anderson et al. veröffentlicht. Die mtDNA ist in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert und liegt als doppelsträngiges, ringförmiges Molekül vor. Sie besteht aus einem inneren cytosinreichen L-Strang (light strand) und einem äußeren guaninreichen H-Strang (heavy strand), wobei der L-Strang für neun und der H-Strang für 28 der insgesamt 37 Gene kodiert. Weitere für das Mitochondrium wichtige Proteine sind kernkodiert und werden aus dem Cytosol ins Mitochondrium transportiert (Anderson et al., 1981).

Verglichen mit der nukleären DNA (nDNA) unterscheidet sich die mtDNA in mehreren Punkten. Es scheint fast jedes Nucleotid Teil einer kodierenden Sequenz zu sein, sodass eine enorme dichte Genpackung vorliegt. Ein wichtiger nicht-kodierender Bereich ist die Kontrollregion, der sogenannte D-Loop (D=displacement). Er dient als Startpunkt für die Replikation und besteht aus drei hypervariablen Bereichen HV1, HV2 und HV3 (HV = hypervariabel) (Greenberg et al., 1983; Lutz et al., 2000). Des Weiteren liegt eine gelockerte Codon-Nutzung vor. Im Mitochondrium werden nur 22 tRNAs für die Proteinsynthese benötigt, wohingegen im Cytosol 30 bis 40 notwendig sind. Zusätzlich weicht auch der genetische Code von dem des Cytosols ab. Vier der 64 Codons haben eine andere Bedeutung als die gleichen Codons im Cytosol (Alberts, Molekularbiologie der Zelle 2003).

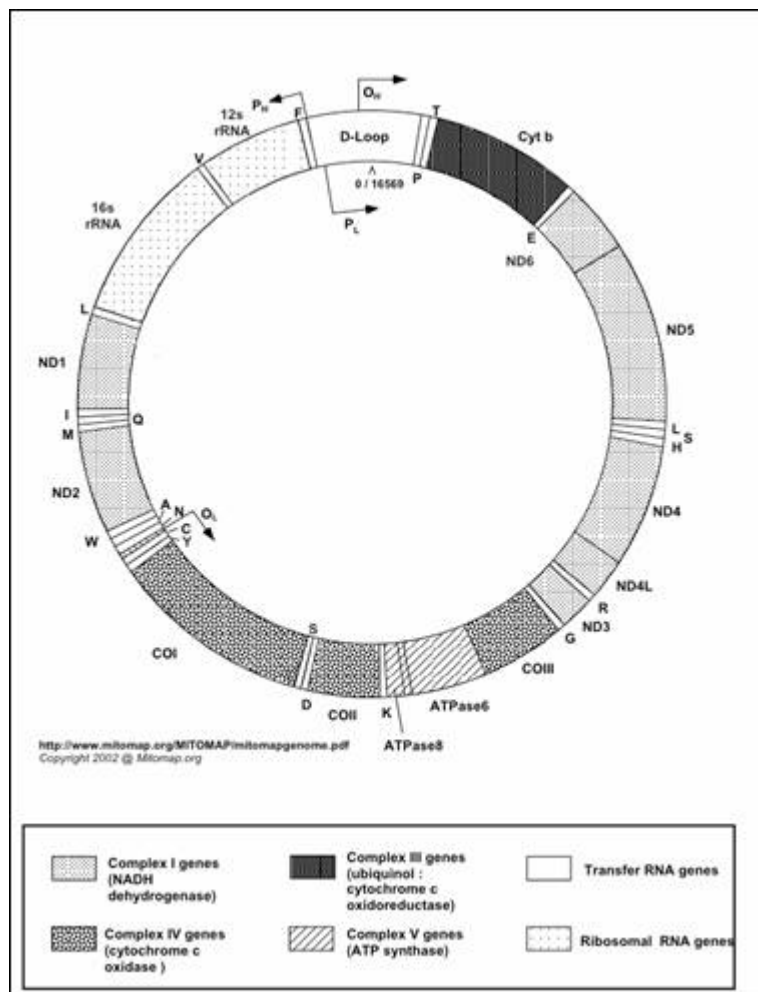


Abbildung 2: Das humane mitochondriale Genom (schematische Darstellung) Die Darstellung zeigt die von Anderson et al. 1981 entschlüsselte mtDNA. (Internet: hu-berlin,de, 2010)

1.1.2. mitochondriale Genese

Die komplette Sequenz der mitochondrialen DNA wurde 1981 von Anderson et al. veröffentlicht und erst 1988 wurden nach intensiven Forschungen Mutationen im mitochondrialen Genom festgestellt. Über eine Punktmutation im ND4-Gen bei Patienten mit einer Leberschen Hereditären Optikus-Neuropathie (LHON) berichteten Wallace et al. (1988). Des Weiteren stellten Holt et al. (1988) eine große Anzahl an Deletionen im mitochondrialen Genom bei Patienten mit mitochondrialen Myopathien fest. Inzwischen sind über 150 Punktmutationen und Hunderte an Veränderungen der mtDNA identifiziert worden, die mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Internet: Mitomap,

2011). Als Ursache für diese Schädigungen der mtDNA stellte Harman vor mehr als über 50 Jahren die Theorie der freien Radikale auf, die besagt, dass für die oxidative Schädigung freie Sauerstoffradikale verantwortlich sind. Die oxidativen Schädigungen der Zellen führen zum Prozess des Alterns und zu altersabhängigen Krankheiten (Harman, 1956; Taylor et al., 2005).

Mitochondrien synthetisieren durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), welche an der inneren Membran der Mitochondrien stattfindet, den größten Teil des zellulären Adenosintriphosphats (ATP). Hierbei werden 90 % des aufgenommenen Sauerstoffs zu H₂O reduziert (Richter 1995). Bei diesem Vorgang werden 1-5 % des aufgenommenen Sauerstoffs in „reactive oxygen species“ (ROS) umgewandelt, zu den Superoxid-Anionen, Hydroxylradikale und H₂O₂ zählen (Beckmann & Ames, 1998). Wenn diese entstehenden ROS nicht durch Antioxidantien ausreichen neutralisiert werden, zerstören sie sowohl Proteine und Fette als auch RNA und DNA (Richter, 1995). Bei den Schädigungen handelt es sich vor allem um Basenmodifikationen, Einzel- und Doppelstrangbrüche und andere Rearrangements.

Auch exogene Faktoren können zusätzlich zu den endogenen freien Radikalen Mutationen hervorrufen. Hierzu gehören u.a. UV-Licht (Birch-Machin et al., 1998), Rauchen von Zigaretten (Ballinger et al., 1996) und Medikamente (Walker et al., 2004). Meistens entstehen die Deletionen der mtDNA zwischen dem „origin of replication“ (ori) des H- und L-Stranges bei 5.760 bp und 190 bp (Bank et al., 2000). Die mtDNA ist gegenüber Mutationen wesentlich anfälliger als die nDNA, da sie weder eigene Reparaturmechanismen noch schützende Histone besitzt. Zusätzlich ist sie in unmittelbarer Nähe zu reaktiven Sauerstoffverbindungen und freien Radikalen der Elektronentransportkette lokalisiert (Ames et al., 1993).

1.1.3. Die 4977 bp common deletion

Bis heute sind eine Reihe von Mutationen der mtDNA bekannt, von denen die 4977bp Deletion am häufigsten vorkommt. Deswegen wird sie auch als „common deletion“ bezeichnet (Simonetti et al., 1992). Ursprünglich wurde sie in zwei mitochondrialen Myopathien entdeckt, dem Kearns-Sayre-Syndrom und der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (Wallace et al., 1992).

Die 4977 bp common deletion ist von zwei 13 bp langen „direct repeats“ [ACCTCCCTCACCA] umgeben. Diese sogenannten „hot spots“ befinden sich im Bereich der bp-Position 8.470-8.482 und 13.447-13.459 der mtDNA. Man geht davon aus, dass diese „hot spots“ eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Deletionen der mtDNA spielen, da hier oxidative Schäden innerhalb der mtDNA leichter zur Trennung der Einzelstränge führen. Diese lagern sich an die „direct repeats“ an und bilden eine Schlaufe, die leicht herausbricht und somit zur Deletion führen kann (Lee & Wie, 1994).

Im Bereich der 4977 bp Deletion befinden sich die Gene der ATPase 6 / 8, COX III, ND3, ND4, ND 4L und ND5. Somit kommt es bei betroffenen Genomen zu einer verminderten oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien. (Münscher et al., 1993). Die verminderte Phosphorylierung wiederum führt zur Entstehung weiterer ROS und somit zur Verstärkung der oxidativen Schädigung und es entsteht ein Teufelskreis (Wallace et al., 1995).

In Probenmaterial gesunder Probanden konnte die spezifische Deletion bereits in mehreren Geweben nachgewiesen werden, unter anderem im Skelettmuskel (Lee et al., 1994), im Zwerchfell und Herzmuskel (Cortopassi et al., 2000), in der Haut (Birch-Machin et al., 1998), im Gehirn (Corral-Debrinski et al., 1992), in der Lunge (Lee et al., 1999), in Spermien (Kao et al., 1995), im Blut und in Blutzellen (Meißner et al., 2000; von Wurmb-Schwark et al., 1998), in den Ovarien (Kitagawa et al., 1993) und in den Knochen (Papiha et al., 1998). Außerdem wurde festgestellt, dass der Deletionsgrad in ausdifferenziertem Gewebe wie Skelettmuskel oder Gehirn höher ist als in schnell proliferierendem Gewebe wie zum Beispiel Blut oder Haut (Cortopassi et al., 1992).

1.2. Quantifizierung der 4977 bp common deletion

Um die 4977 bp common deletion mittels PCR nachzuweisen, müssen deletionsspezifische Primer eingesetzt werden die den Deletionsbereich flankieren. Bei einem intakten Genom liegt zwischen den Primern ein 5 kb großer Bereich, der unter gegebenen PCR-Bedingungen nicht amplifiziert werden kann. Wenn dagegen ein deletiertes Genom vorliegt, fehlt dieser knapp 5 kb lange Bereich und die Primer liegen dicht genug beieinander, sodass es zur Amplifizierung des deletionsspezifischen Fragments kommt (Cortopassi et al., 1992).

Zusätzlich zur Deletion wird die nukleäre DNA und die gesamte mtDNA bestimmt. Dadurch lässt sich der Anteil deletierter mtDNA in den Proben pro Zelle und pro ml DNA-Genom bestimmen. Die Quantifizierung erfolgt mittels Realtime-PCR am ABI 7300. Ein Teil der Proben wurde zur Überprüfung der Ergebnisse zusätzlich mittels Duplex-PCR am ABI Prism 310 Genetic Analyzer quantifiziert.

1.2.1. absolute Quantifizierung mittels Realtime-PCR

Die Realtime-PCR ist eine PCR, bei der die Menge der Amplifikate direkt während der Entstehung erfasst wird. Dies wird durch sequenzspezifische Sonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind möglich. Des Weiteren gibt es Sonden, die an einem Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter und am anderen Ende mit einem Quencher-Molekül verbunden sind (Abb.3).

In der Annealing-Phase binden nun die sequenzspezifischen Primer und zusätzlich die sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden an die Zielsequenz. Bei der Verwendung von TaqMan-Sonden können zunächst keine Signale gemessen werden, da die Fluoreszenzemission des Reporters von dem Quencher-Molekül unterdrückt wird. Bindet nun die Fluoreszenzsonde an den komplementären DNA-Strang und wird von der Taq-Polymerase erreicht, wird durch deren 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonde hydrolytisch gespalten und der Reporter wird vom Quencher abgetrennt. Durch die Trennung wird der Reporter angeregt und emittiert Licht in der erwartenden Wellenlänge. Diese Emission kann dann durch optische Detektoren gemessen werden. (Holland et al., 1991)

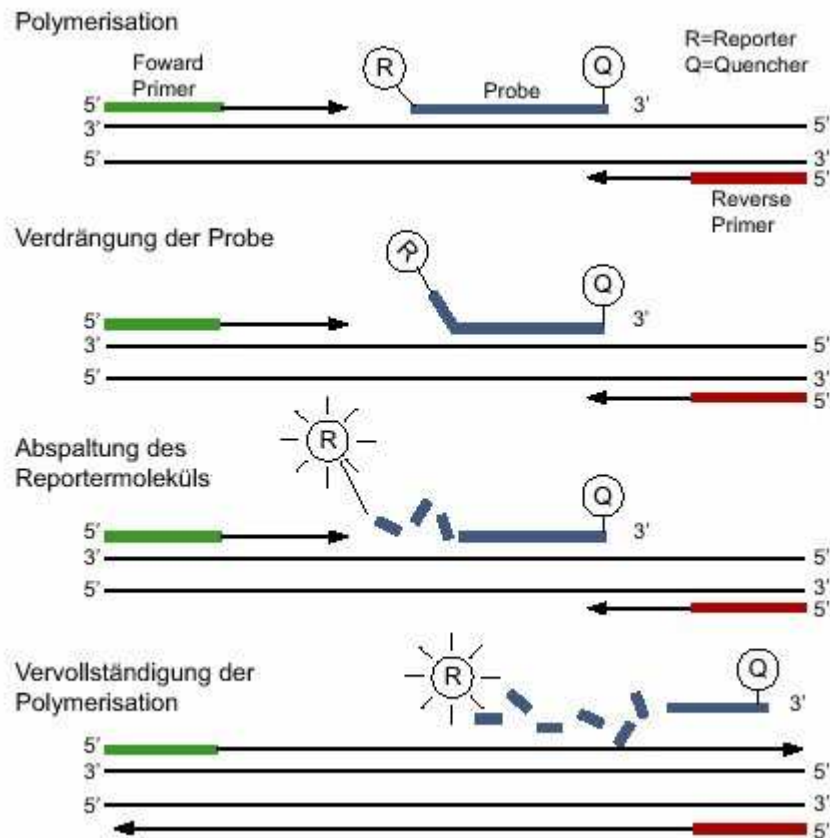


Abbildung 3: Prinzip der Realtime-PCR (schematische Darstellung). Die Primer und Sonden lagern sich an die spezifische DNA-Sequenz an. Sobald die Taq-Polymerase die Sonde erreicht, wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten und es kommt zur Trennung des Reporters (R) von dem Quencher-Molekül (Q). Die Fluoreszenz wird nun messbar. Anschließend löst sich die Sonde vom DNA-Strang und die Elongation läuft weiter. (Internet: www.medizinische-genetik.de)

1.2.2. relative Quantifizierung mittels Duplex-PCR

Die Duplex-PCR ist eine Methode, bei der zwei Fragmente gleichzeitig amplifiziert werden können. Diese werden anschließend mittels Kapillarelektrophorese untersucht. Hierfür werden markierte Vorwärtsprimer eingesetzt, wodurch das Gerät die Fragmente aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung erkennen und analysieren kann. Die Software ermittelt mit Hilfe von Standards die Größe der markierten Fragmente und stellt diese als unterschiedliche Peaks im Elektropherogramm dar (Abb.4). Die Höhen und Flächeninhalte der unterschiedlichen Peaks werden von der Software in relativen Einheiten angegeben und somit wird eine Aussage über die relative Quantität und die Verhältnisse der einzelnen Amplifikate zueinander ermöglicht.

In diesem Fall werden ein 260 bp großes Fragment der Wildtyp-mtDNA und ein 238 bp großes deletionsspezifisches Fragment der mtDNA amplifiziert und dargestellt (von Wurmb et al., 1998).

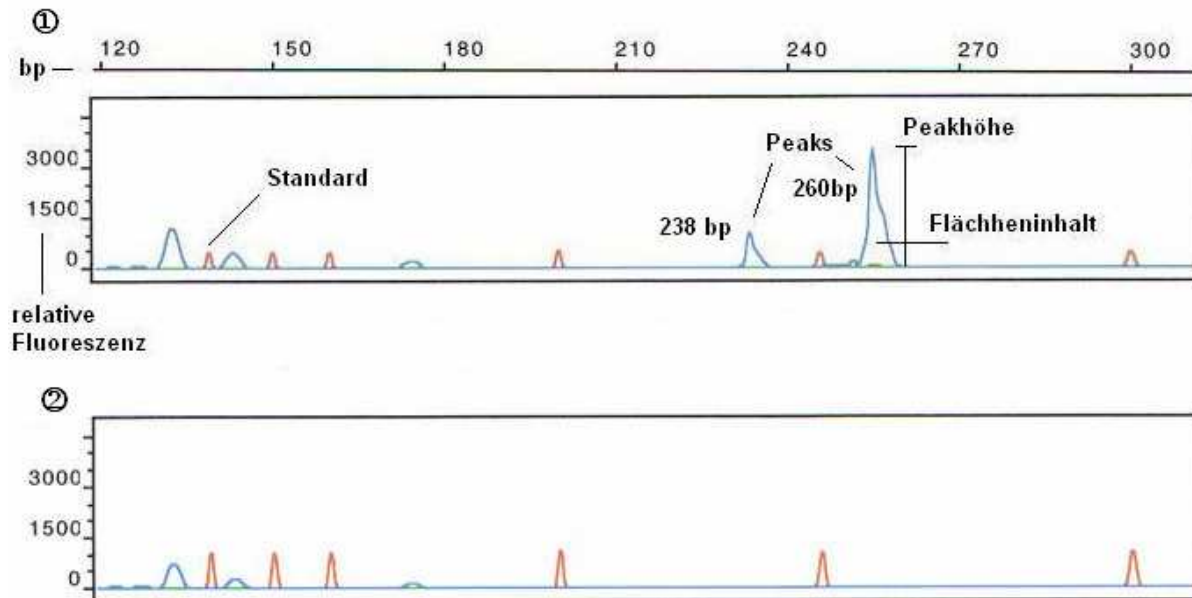


Abbildung 4: Elektropherogramm (Abbildung nach Duplex-PCR am ABI Prism® 310 Genetic Analyzer). 1) Dargestellt ist ein Elektropherogramm, bei dem zwei Peaks bei 238 und 260bp erkennbar sind. Die Peaks stehen für zwei Fragmente, die in der Duplex-PCR amplifiziert und anschließend mittels Kapillarelektrophorese analysiert wurden. 2) Bei diesem Elektropherogramm handelt es sich um eine Negativkontrolle. (Röpke et al., 2007)

1.3. Plazenta und Nabelschnur

In der vorliegenden Arbeit wurde das Plazenta- und Nabelschnurgewebe von HIV-infizierten Schwangeren unter Azidothymidin-Therapie und Kontrollpersonen, HIV-infizierte Schwangere ohne Therapie, bezüglich der mitochondrialen Mutagenese untersucht.

1.3.1. Funktion

Die Plazenta besteht sowohl aus mütterlichem als auch aus embryonalem Gewebe und dient während der Schwangerschaft zur Versorgung des Embryos bzw. Feten mit Nährstoffen, gewährleistet den Gasaustausch und entsorgt Exkretionsprodukte des Embryos. Diese Aufgaben werden von der Plazentaschranke übernommen.

Hierbei handelt es sich um ein passives Filtersystem, welches wegen des zwischen mütterlichem und embryonalem bzw. fetalem Kreislauf herrschenden Druckgefälles die Diffusion im Blut gelöster Substanzen erlaubt oder verhindert (Diedrich, 2007).

Die Nabelschnur, welche aus embryonalem Gewebe besteht, verbindet den Embryo bzw. Feten mit der Plazenta und stellt somit die Versorgung des Embryos sicher (Diedrich, 2007).

1.3.2. Anatomie

Das Plazantagewebe besteht aus dem maternalen Teil (Decidua basalis) und dem fetalen Teil (Chorion frondosum). Makroskopisch lässt sie sich in drei Abschnitte aufteilen, die Basalplatte welche dem Uterus zugewandt ist, die Chorionplatte welche sich auf der embryonalen Seite befindet und den dazwischen liegenden intervillösen Raum, in dem sich die Chorionzotten befinden (Abb.5).

Die Basalplatte bildet mehrere Plazentasepten aus, die die mütterliche Seite in mehrere Funktionseinheiten unterteilen. Sie begrenzt den intervillösen Raum zum Uterus hin. In ihr verlaufen mehrere uteroplazentare Venen und Arterien, die in den intervillösen Raum münden.

Die Chorionplatte bildet den Abschluss zur Amnionhöhle. Sie besteht aus einschichtigem Amnionepithel, Chorionstroma, Chorionepithel und den Chorionzotten, welche in den intervillösen Raum hineinragen. Des Weiteren verzweigen sich in ihr die Nabelschnurgefäße.

Im intervillösen Raum, der zwischen Basal- und Chorionplatte liegt, befindet sich mütterliches Blut und die von der Chorionplatte ausgehenden Chorionzotten. Er stellt das Zirkulationskompartiment des mütterlichen Blutes dar. Die Chorionzotten dienen zur Vergrößerung der Kontaktfläche mit dem mütterlichen Blut und gewährleisten den Stoffaustausch zwischen maternalen und embryonalen Kreislauf. (Gruber, 2007; Fritsch, 2005; Diedrich, 2007).

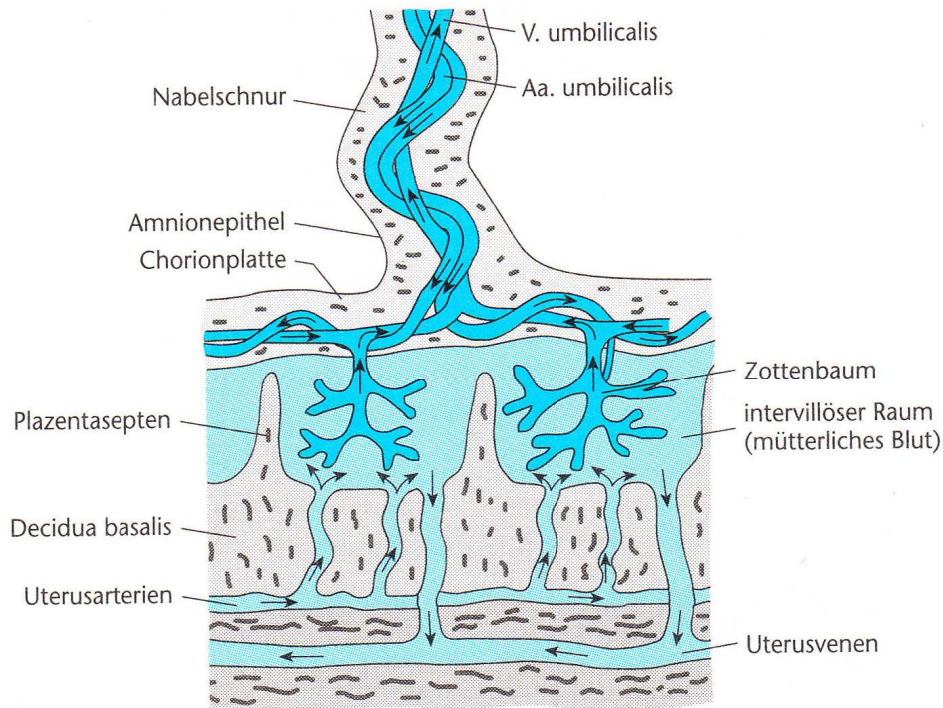


Abbildung 6: schematische Darstellung der Plazenta und Nabelschnurgefäße. Die Decidua basalis (Basalplatte) begrenzt die Plazenta zum Uterus hin, in dem sie Uterusarterien und -venen verlaufen. Von ihr ausgehend ragen die Plazentasepten in den intervillösen Raum hinein, in dem sich mütterliches Blut und die Zottenbäume befinden. Zur embryonalen Seite hin wird die Plazenta von der Chorionplatte abgegrenzt, der direkt das Amnionepithel aufliegt. In der Nabelschnur verlaufen zwei Arterien, in denen das Blut vom Embryo zur Plazenta fließt und eine Vene mit umgekehrtem Blutfluss. (aus Gruber, 2007)

1.4. Zidovudin

Zidovudin auch bekannt als Azidothymidin (AZT) ist ein bereits 1964 synthetisiertes Thymidin-Analogon und gehört in die Gruppe der nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI). Um seine Wirkung zu entfalten, bedarf es einer intrazellulären Phosphorylierung durch die spezifische zelluläre Kinase, welche es in das entsprechende Nukleotid-Triphosphat umwandelt. Zielenzym des Triphosphat ist die Reverse Transkriptase des HI-Virus, bei der es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase handelt. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe am Zucker wirkt das Nukleosid als „chain terminator“ und führt zum Abbruch der DNA-Synthese. Dadurch wird die zur Replikation des HI-Virus erforderliche Umschreibung von RNA in DNA blockiert und die Vermehrung des Virus wird aufgehalten. Dies erklärt auch, warum Zidovudin gegen bereits inkorporierte Viren unwirksam ist und nur den Befall weiterer Zellen verhindern kann.

1.4.1. Zidovudin in der Anwendung bei HIV

Indikationen zur Gabe von Zidovudin im Rahmen einer HIV-Infektion sind das Absinken der T-Helfer-Zellen unter 350 / μ l, eine hohe Viruslast mit mehr als 100.000 RNA-Kopien / ml Blut, das klinische Fortschreiten der Erkrankung sowie die Entwicklung des Vollbildes von AIDS. Des Weiteren dient es zur Postexpositionsprophylaxe bei Stichverletzungen und zur Vorbeugung der Infektion des Kindes bei HIV-infizierten Schwangeren. Die Behandlung mit Zidovudin sollte in einer Kombinationstherapie erfolgen um einer Resistenzentwicklung, die bei einer Monotherapie meist innerhalb von sechs Monaten oder früher entsteht, vorzubeugen. Als besonders effektiv gelten die fixen Kombinationen von Zidovudin und Lamivudin (Combivir®) und Zidovudin, Lamivudin und Abacavir (Trizivir®). Abacavir und Lamivudin gehören ebenfalls zur Gruppe der NRTIs. (Mutschler, 2008; Herdegen, 2008).

1.4.2. Schädigungen durch Zidovudin

Allgemeine Nebenwirkungen von Zidovudin sind Müdigkeit, Kopfschmerzen, Übelkeit und Diarrhöen. Eine der wichtigsten Langzeitnebenwirkungen ist die Knochenmarksdepression, die bei den Patienten zur Anämie und Leukopenie führen kann. Des Weiteren kommt es zur Laktatazidose, Polyneuropathien, Pankreatitiden und Lipodystrophie. Manche dieser Langzeitschäden sind auf eine mitochondriale Toxizität zurückzuführen, da auch die mitochondriale DNA-Polymerase gehemmt wird (Herdegen, 2008; Mutschler, 2008).

Weitere Effekte von Zidovudin sind Neutropenie, Hepatotoxizität, Kardiomyopathie und Myopathie. Bei den Zidovudin-induzierten Myopathien kommt es zu generalisierten Muskelschmerzen, Schwäche und Erschöpfung. In Muskelbiopsien zeigten sich „ragged red fibers“, strukturell abnorme Mitochondrien und eine Depletion der mtDNA (Scruggs et al., 2008). Sowohl McComsey et al. (2008), als auch Aldrovandi et al. (2009) zeigten eine erhöhte Menge an mtDNA-Kopien in mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei Kindern unter Zidovudin-Exposition. Eine erhöhte intrazelluläre und mitochondriale Hydroperoxidkonzentration zeigte sich unter Zidovudintherapie in humanen Endothelzellen der Aorta (Kline et al., 2008). Gengelmaier et al. (2009) berichtet über eine sowohl reduzierte Anzahl von mtDNA-

Kopien als auch über eine verminderte Rate der Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten II und IV in der Plazenta unter Zidovudin. In Nabelschnurgewebe Zidovudin-exponierter Kinder zeigte sich gegenüber nicht-exponierten Kindern eine vermehrte Sequenzvariante der mitochondrialen tRNA, bei der es sich meistens um den Austausch einer Aminosäure handelt (Torres et al., 2008). Auch unter dem Elektronenmikroskop sind morphologische Veränderungen des Nabelschnurgewebes bei in-utero-exponierten Kindern erkennbar (Divi et al., 2004).

1.5. Humanes Immundefizienz-Virus

Das „human immune deficiency virus“ (HIV) gehört zu den Retroviren, die ihre RNA in infizierten Zellen mithilfe der eigenen Reversen Transkriptase in DNA umschreiben können und diese dann durch die virale Integrase ins Wirtsgenom einschleusen. HIV wurde das erste Mal 1983 von Montagnier und Barré-Sinoussi entdeckt. In seiner Vollaussprägung führt HIV zum „acquired immune deficiency syndrome“ (AIDS) (Schütt, 2009; Hof, 2005).

1.5.1. Epidemiologie von HIV

Es gibt zwei verschiedene Genotypen, HIV 1 und HIV 2. HIV 2 kommt im Wesentlichen in Westafrika vor und ist noch näher mit dem affenspezifischen „simian immune deficiency virus“ (SIV) verwandt, während HIV 1 eine Pandemie ausgelöst hat (Hof, 2005).

Im Jahr 2009 waren weltweit 33,3 Millionen Menschen an HIV erkrankt, wovon 22,5 Mio. alleine auf das subsaharische Afrika entfielen. Hierbei kam es insgesamt zu 2,6 Mio. Neuinfektionen auf der ganzen Welt von denen 260.000 Kinder betroffen waren und zu 1,8 Mio. Neuinfektionen in Afrika südlich der Sahara. Insgesamt sind 1,8 Mio. Menschen 2009 an HIV gestorben, wobei es sich bei 260.000 um Kinder handelte und 1,3 Mio. der Todesfälle auf Subsahara-Afrika zurückfallen. Die Prävalenz von HIV in der Altersgruppe von 15-49 Jahren beträgt in Afrika 5 % und weltweit 0,8 %. Insgesamt zeigte sich im Vergleich zum Jahr 2001 in 33 Ländern weltweit ein Rückgang der Neuinfektionen um mehr als 25 %. Auch in Afrika belegen nationale Studien einen signifikanten Rückgang der HIV-Prävalenz bei jungen Frauen und

Männern in den Ländern Botswana, Sambia, Simbabwe, Südafrika und Tansania (Internet: www.unaids.org, 2011).

1.5.2. HIV und Schwangerschaft

In Westeuropa und den USA ist seit Einführung der antiretroviralen Transmissionsprophylaxe und der elektiven Sectio caesarea die perinatale HIV-Transmissionsrate von 15 % in den 90er Jahren auf heute unter 2 % gefallen. Wann die Therapie in der Schwangerschaft begonnen wird, hängt von der mütterlichen Indikation ab. Bei mütterlichen Indikationen wird in der Regel ab der 13. Schwangerschaftswoche (SSW) begonnen. Fehlt die mütterliche Indikation wird bei einer niedrigen Viruslast eine Transmissionsprophylaxe ab der 32. SSW durchgeführt. Bei einer höheren Viruslast oder einer Risikoschwangerschaft soll eine Prophylaxe bereits in der 28. SSW bzw. 12 Wochen vor Entbindung begonnen werden. Für symptomfreie Mütter gilt, dass eine antiretrovirale Therapie bei einer CD₄ – Zellzahl unter 350 / µl oder bei einer Viruslast von mehr als 50.000 HIV-RNA-Kopien / ml durchgeführt werden sollte. Eine maximale Virussuppression auf unter 50 HIV-RNA-Kopien / ml macht eine HIV-Transmission unwahrscheinlich.

In der Schwangerschaft wird normalerweise eine Kombinationstherapie durchgeführt, hierbei handelt es sich meistens um eine Kombination aus Zidovudin und Lamivudin oder eine Dreifachkombination mit Zidovudin, Lamivudin und einem Proteaseinhibitor. Zidovudin ist plazentagängig und kann somit zu toxischen Schäden sowohl bei der Mutter als auch beim Kind führen. Allerdings zeigte sich bisher, dass die Teratogenität durch die Gabe von NRTIs sicher nicht mehr als zweifach ansteigt.

Um eine Mutter-Kind-Übertragung von HIV zu verhindern ist nicht nur die retrovirale Prophylaxe während der Schwangerschaft wichtig, sondern es gilt auch das perinatale Infektionsrisiko einzudämmen. Insgesamt kommt es in 75 % unter oder in den letzten Wochen vor der Geburt zu einer HIV-Übertragung, 10 % entfallen auf die vertikale HIV-Infektion vor dem dritten Trimenon und 10-15 % werden durch Stillen übertragen. Risikofaktoren einer HIV-Transmission sind unter anderem eine hohe Viruslast, Frühgeburten und ein vorzeitiger Blasensprung. Zur Prävention der perinatalen HIV-Infektion gehören eine antiretrovirale Prophylaxe vor und unter der Geburt und eine primäre Sectio caesarea am wehenlosen Uterus, da das

Transmissionsrisiko bei einer vaginalen Geburt mit einer Viruslast von mehr als 1000 Kopien / ml erhöht ist. Des Weiteren sollte eine postnatale antiretrovirale Postexpositionsprophylaxe der Kinder durchgeführt und das Stillen vermieden werden. (Internet: www.hivbuch.de, 2010).

2. ZIELSETZUNG

Veränderungen der mitochondrialen DNA (mtDNA) sind seit langer Zeit bekannt. Insbesondere Deletionen wurden zuerst im Zusammenhang mit spezifischen degenerativen Erkrankungen in postmitotischen Geweben wie Muskulatur und Hirn entdeckt. In diesen Geweben existiert darüber hinaus eine relative enge Korrelation zum Lebensalter. Die meisten Deletionen nehmen mit steigendem Lebensalter zu. Insbesondere die 4977 bp Deletion zeigt diesen engen Zusammenhang und kommt sehr häufig und in relativ hoher Menge in ausdifferenzierten Geweben vor. Ende der 90er Jahre wurde die 4977 bp Deletion erstmals in Blutproben von jungen und gesunden Probanden gefunden. Dabei existiert die Möglichkeit, dass die mitochondriale Mutagenese im Blut vorrangig von externen Einflüssen beeinflusst wird, unter anderen der Ernährung. Des Weiteren ist es bekannt, dass bestimmte Medikamente eine schädigende Wirkung auf das mitochondriale Genom ausüben können. Insbesondere zur Behandlung mit Azidothymidin (AZT) existieren bisher mehrere Untersuchungen, wobei sowohl ein Anstieg als auch ein Abfall der gesamten mtDNA im Blut gefunden wurde. Auch in Nabelschnurgewebe zeigten sich Veränderungen durch AZT. Es wurde sowohl von elektronenmikroskopischen morphologischen Veränderungen als auch von Depletion der mtDNA berichtet. In Plazentagewebe ließ sich ebenfalls ein Abfall der Menge an mtDNA unter AZT-Therapie zeigen.

In diesem Projekt soll die mitochondriale Mutagenese unter dem Einfluss von AZT in Nabelschnur- und Plazentagewebe bei HIV-infizierten Schwangeren untersucht werden. Dabei wird erstmals zusätzlich zum Verhältnis mtDNA zur nukleären DNA das Vorkommen und die Menge der 4977 bp Deletion bestimmt. Diese Deletion ist bekannt als Markermolekül für mitochondrialen Stress und gilt damit als zusätzlicher Indikator für einen Einfluss des Medikaments AZT auf den Zellhaushalt. Hierbei werden insgesamt jeweils 61 Proben aus Plazenta und Nabelschnur von HIV-infizierten Müttern und deren Kindern unter AZT-Therapie und jeweils 61 Plazenta- und Nabelschnurproben von HIV-infizierten Frauen und deren Neugeborenen ohne antiretrovirale Therapie untersucht.

Die absolute Quantifizierung der 4977 bp Deletion, sowie der gesamten Menge an mtDNA und nDNA wird mittels Realtime-PCR durchgeführt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde innerhalb einer Studie vom Institut für Tropenmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Prävention der HIV-Mutter-Kind-Übertragung am Kyela Distrikt Krankenhaus in der Region Mbeya im Süden Tansanias gewonnen. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission am National Institute for Medical Research in Dar es Salaam bewilligt. Es wurden insgesamt 158 Plazenta- und 165 Nabelschnurproben abgenommen, von denen jeweils 122 Nabelschnur- bzw. Plazentaprobe in dieser Arbeit bearbeitet wurden. Bei den 122 Proben handelt es sich jeweils um 61 Patientinnen aus der Behandlungs- und 61 Patientinnen aus der Kontrollgruppe. Zur Geburt wurden je Patientin zwei kleine Stücke von Plazenta und Nabelschnur abgenommen. Diese wurden in Cryovials ohne jede Zusätze bei -20°Celsius eingefroren. Proben, die nicht sofort eingefroren werden konnten, z.B. Proben vom Wochenende wurden solange bei Kühlschranktemperaturen verwahrt. Insgesamt wurden die Proben in Tansania für ein Jahr gelagert und Ende 2009 nach Deutschland transportiert.

Von allen 122 untersuchten Nabelschnur- bzw. Plazentaprobe wurde die mtDNA-Menge, die nukleare DNA-Menge und die 4977 bp Deletion bestimmt.

Behandlungsgruppe:

Bei der Behandlungsgruppe handelt es sich um HIV-infizierte Mutter-Kind-Paare, die ab der 28.Schwangerschaftswoche (SSW) mit Azidothymidin (AZT) behandelt wurden. Die Frauen hatten ein durchschnittliches Alter von 28 Jahren (25 – 30 Jahre).

Kontrollgruppe:

Die Kontrollpersonen waren HIV-infizierte Schwangere mit einem durchschnittlichen Alter von 25 Jahren (23 – 29 Jahre), die während der gesamten Schwangerschaft kein AZT eingenommen haben.

3.2. DNA-Extraktion

Das Probenmaterial wurde mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit extrahiert. Im Anschluss an die Extraktion wurde die Qualität der DNA auf einem 1%igen Agarosegel überprüft und die Quantität mittels Realtime-PCR ermittelt.

3.2.1. Vorversuche zur DNA-Extraktion

Um bei den Extraktionen aus Plazenta und Nabelschur die beste Ausbeute zu erhalten, wurden zuerst einige Vorversuche durchgeführt. Es erfolgten mehrere Extraktionen mit unterschiedlichen Mengen an Probenmaterial. Anschließend wurden die Proben auf ein 1%iges Agarosegel gegeben um die Quantität und Qualität der DNA-Extrakte zu überprüfen. Danach wurden die Proben mittels Realtime-PCR quantifiziert.

Es wurde zum Vergleich DNA aus jeweils fünf verschiedenen Mengen der gleichen Plazenta- bzw. Nabelschnurprobe extrahiert. Bei der Plazentaprobe wurden die Mengen 120, 100, 50, 25 und 12,5 mg und bei der Nabelschnurprobe 200, 100, 50, 25 und 12,5 mg eingesetzt. Im Anschluss an die Extraktion wurden die Proben zur Überprüfung der DNA-Qualität und –Quantität in die Gelelektrophorese eingesetzt. Für ein 1 % iges Agarosegel werden 1 g Agarose, bei der es sich um ein aus roten Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid handelt, mit 100 ml 1 x TBE-Puffer versehen und in der Mikrowelle (Severin) kurz aufgeköcht. Es werden nach Abkühlung auf etwa 70 ° C 5 µl Ethidiumbrimid von Invitrogen (10 mg / ml) hinzugefügt, welches später mit der DNA interkaliert und diese im UV-Licht sichtbar werden lässt. Das Ganze wird in die vorbereitete Gelkammer (Roth) gegossen und mit Kämmen versehen. Diese sorgen bei der späteren Aushärtung für die Bildung von Aussparungen im Gel. Das Gel ist nach ungefähr 40 Minuten ausgekühlt und die Agarose zu einem Netzwerk von kleinen Poren ausgehärtet, in dem die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Sobald das Gel komplett ausgehärtet ist, wird dieses in der Gelkammer (Roth) mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Zu 5 µl Probe werden jeweils 5 µl Ladepuffer, der mit Bromphenolblau versehen ist, hinzugefügt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. In die äußersten Taschen werden 5 µl des Hyperladder I (Biolone) pipettiert, die für die spätere Fragmentgrößenbestimmung bedeutsam ist. Die

Elektrophorese erfolgt in der Gelkammer (Roth) für 30 min bei 110 V. Im Anschluss werden die Fragmente auf dem Gel in einem GelDoc™ EQ (Biorad) sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.2. Extraktion aus Plazenta und Nabelschnur

Die DNA aus Plazenta und Nabelschnur wurde mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit von Invitex extrahiert. Für die Extraktion wird zunächst der Waschpuffer aus 105 ml Ethanol (96 %) und 45 ml Waschpufferkonzentrat angesetzt. Des Weiteren ist es von Vorteil den Elutionspuffer einige Minuten vor dem Eluieren auf 60 °C aufzuwärmen.

Als erstes werden 12,5 mg von der Plazentaprobe bzw. 25 mg von der Nabelschnurprobe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 400 µl Lysispuffer und 40 µl Proteinase K (40 mg auf 2 ml) dazugegeben. Anschließend wird alles gut gevortext und über Nacht im Thermoschüttler bei 52 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proben bei 13.000 upm für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In dieses Reaktionsgefäß werden nun 200 µl Bindingpuffer T gegeben, gevortext und anschließend auf einen Filter in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun müssen die Proben bei Raumtemperatur eine Minute inkubieren und werden danach bei 12.000 upm für zwei Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wird anschließend verworfen. Im Anschluss daran werden 550 µl Waschpuffer dazugegeben, für eine Minute bei 12.000 upm zentrifugiert und das Filtrat wiederum verworfen. Dieser Waschvorgang wird noch ein zweites Mal wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift werden die Proben noch einmal für zwei Minuten bei 12.000 upm zentrifugiert und die Filter werden anschließend auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Als letztes erfolgt der Elutionsschritt. Hierzu werden 60 µl auf 60 °C vorgewärmter Elutionspuffer D auf die Filter gegeben, bei Raumtemperatur für drei Minuten inkubiert und anschließend bei 10.000 upm für eine Minute zentrifugiert. der Elutionsschritt wird mit der gleichen Menge Elutionspuffer einmal wiederholt. Am Ende werden die Filter verworfen und im 1,5 ml Reaktionsgefäß befindet sich das Eluat, welches die DNA enthält und für weitere Versuche benötigt wird.

3.3. absolute Quantifizierung mittels Realtime-PCR

Wie in Abschnitt 1.2.1. beschrieben handelt es sich bei der Realtime-PCR um ein Verfahren bei der die Menge der Amplifikate direkt während der Bildung erfasst werden kann. In diesem Fall wurde einmal eine Singleplex-Realtime-PCR zur Untersuchung der nukleären DNA und eine Duplex-Realtime-PCR zur Untersuchung der Menge an mtDNA und deletionsspezifischen Fragment verwendet. Die absolute Quantifizierung der verschiedenen Fragmente erfolgte mittels Fluoreszenz-Messungen am ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

3.3.1. Singleplex-Realtime-PCR zur Quantifizierung von nDNA

In der Singleplex-Realtime-PCR wird ein 98 bp Fragment aus dem Telomerase-Gen amplifiziert, welches mit Hilfe von NED markierten Sonden detektiert wird (von Wurmb-Schwark et al., 2005). Zusätzlich zu den Proben wird eine Standardreihe mit DNA-Proben bekannter Menge amplifiziert. Anhand dieser kann die Menge nukleärer Moleküle in der Probe extrapoliert werden. Die eingesetzten Mengen in der Standardreihe sind 0,01 ng, 0,1 ng, 1 ng, 10 ng und 100 ng.

Pro Ansatz werden 23 µl Mastermix und 2 µl von der DNA-Probe in spezielle Thermo-Fast® 96 Detection Plates (Abgene) pipettiert und wie im Abschnitt 3.3.2. weiter verarbeitet. Der genaue PCR-Ansatz und das Thermoprofil sind in Abschnitt 7.2.1.1. (Tabelle 2/3) detailliert angegeben.

3.3.2. Duplex-Realtime-PCR zur Quantifizierung von absoluter und spezifischer 4977 bp deletierter mtDNA

In der Duplex-PCR wird gleichzeitig ein wildtyp- und 4977 bp deletionsspezifisches Fragment der mtDNA amplifiziert und analysiert. Die wildtypspezifischen Primer amplifizieren ein 113 bp großes Fragment, welches sich innerhalb des ND1-Gens der mtDNA befindet und mittels einer FAM markierten Sonde detektiert wird. Die deletionsspezifischen Primer wiederum binden innerhalb des ND5- und ATPase8-Gens der mtDNA und amplifizieren ein 122 bp großes Fragment, welches mit Hilfe VIC markierter Sonden detektiert werden kann (Storm et al., 2002).

Durch den Einsatz verschieden markierter Sonden kann die Sequence Detection Software des ABI 7300 die unterschiedlichen Fragmente anhand ihrer Fluoreszenz erkennen und unterscheiden. In jeder Realtime-PCR wird zusätzlich zu den Proben eine Standardreihe quantifiziert, anhand der die Software eine Standardkurve für die Extrapolation herstellt. Es werden in der Duplex-PCR mehrere sowohl Wildtyp- (10^6 - 10^4) als auch Deletionsstandards (10^{4-1}) eingesetzt, damit die Menge an gesamter und deletierter mtDNA in den Proben quantifiziert werden kann.

Die Probenansätze setzen sich aus 23 µl Mastermix und 2 µl DNA-Probe zusammen. Sie werden in spezielle Thermo-Fast® 96 Detection Plates (Abgene) pipettiert, mit einem Optical Adhesive Cover von Applied Biosystems verschlossen und für 2 min. bei 2000 upm zentrifugiert. Die Proben und die Standards werden jeweils in Doppelbestimmung pipettiert, damit die Software aus beiden gemessenen Werten einen Mittelwert bilden kann. Um eine Kontamination ausschließen zu können wird zusätzlich bei jeder Realtime-PCR eine Negativkontrolle in Doppelbestimmung quantifiziert. Zusätzlich ist die Kurve der Negativkontrolle für das Festlegen der ct-Linie notwendig, da die ct-Werte immer über denen der Negativkontrolle liegen müssen. Der genaue PCR-Ansatz und das PCR-Profil sind in Abschnitt 7.2.1.2. (Tabelle 4/5) detailliert angegeben.

3.4. Relative Quantifizierung mittels Duplex-PCR

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2. beschrieben handelt es sich bei der Duplex-PCR um eine PCR mit der man zwei Fragmente gleichzeitig amplifizieren kann. In diesem Fall wird sowohl ein wildtypspezifisches als auch eine deletionsspezifisches Fragment amplifiziert. Die relative Quantifizierung der beiden Fragmente erfolgt anschließend mittels kapillarelektrophoretischer Auftrennung am ABI Prism® 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystem.

3.4.1. Duplex-PCR

In der Duplex-PCR wird ein 238 bp deletionsspezifisches und ein 260 bp wildtypspezifisches Fragment der mtDNA amplifiziert. Für die Amplifizierung der Wildtyp mtDNA werden die Primerpaare L15 / H16 und für das deletionsspezifische Fragment die Primerpaare L35 / H45 eingesetzt (v. Wurmb-Schwark et al., 2002).

Um die Detektion mittels Kapillarelektrophorese zu ermöglichen sind die jeweiligen Vorwärtsprimer am 5'-Ende FAM-markiert. Die genauen Primerdaten sind in Abschnitt 8.1. (Tabelle XXX) angegeben.

Jeder PCR-Ansatz setzt sich aus 10,5 µl Mastermix und 2 µl DNA zusammen, so dass sich insgesamt ein Endvolumen von 12,5 µl ergibt. Die PCR-Ansätze werden in 0,2 ml Reaktionsgefäße (Biomers) pipettiert und anschließend zur Amplifikation in den PCR-Cycler (Applied Biosystem) gegeben. In jedem Durchgang wird eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle dient zur Bestätigung einer korrekten Amplifizierung und die Negativkontrolle soll eine Kontamination ausschließen. Der genaue PCR-Ansatz und das PCR-Profil sind in Abschnitt 7.2.2. (Tabelle 6/7) angegeben.

3.4.2. relative Quantifizierung mit Hilfe des ABI Prism® Genetic Analyzer

Zur Analyse werden die beiden amplifizierten Fragmente in den ABI Prism® Genetic Analyzer gegeben. Die FAM markierten Fragmente werden beim Wandern durchs Polymer von einem Laser erfasst und mit dem Standard Gene Scan™ 500 Rox verglichen, der aus definierten DNA-Fragmenten von 50 bp bis 500 bp Größe besteht. Die Daten werden durch die Software des ABI Prism® 310 in Form von Peaks dargestellt und deren Flächeninhalt kann für die relative Quantifizierung untereinander in Relation gesetzt werden.

Für die Analyse wird jeweils 1 µl aus der Duplex-PCR zu 12 µl Mastermix, bestehend aus 11,8 µl Formamid und 0,2 µl Größenstandard Gene Scan™ 500 Rox, in 0,5 ml Genetic Analyzer Sample Tube von Applied Biosystems pipettiert. Anschließend mit einem Gummisepta verschlossen und im ABI Prism® Genetic Analyzer analysiert.

3.5. Powerplex(PP16)-PCR zur Individualisierung

Die Powerplex-PCR ist eine Multiplex-PCR, die in der Rechtsmedizin routinemäßig zur Erstellung von individuellen Merkmalsmustern bei Abstammungsgutachten eingesetzt wird. Hierbei können 15 polymorphe „short tandem repeats“ (STRs), sowie die geschlechts-determinierenden Amelogenin-spezifischen Fragmente simultan amplifiziert werden. STRs sind Genorte, die eine kurze sich wiederholende Einheit von 3-7 bp Länge enthalten und sind weit über das ganze Genom verbreitet.

Die Allele der STRs werden aufgrund ihrer Kopienzahl und der damit verbundenen Längenunterschiede determiniert. Die Anzahl dieser Kopien ist individualspezifisch und wird mit je einer Kopie von beiden Eltern auf das Kind vererbt.

Diese PCR enthält eine Geschlechtsbestimmung (Amelogenin) und ermöglicht die Detektion von 15 autosomalen Markern (D3S1358, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D8S1179, CSF1PO, Penta_D, Penta_E, THO1, vWA, TPOX und FGA).

Jeder PCR-Ansatz setzt sich aus 5,25 µl Mastermix und 1 µl Probe zusammen, so dass sich ein Endvolumen von je 6,25 µl ergibt. In jedem Durchgang wird sowohl eine Positivkontrolle, die zur Bestätigung eines korrekten Durchgangs dient, als auch eine Negativkontrolle zum Ausschluss von Kontamination mitgeführt. Jeder PCR-Ansatz wird in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß von Biomers pipettiert und im PCR-Cycler amplifiziert. Im Anschluss an die PCR werden die unterschiedlichen Fragmente mittels Kapillarelektrophorese am ABI Prism® 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems detektiert. Für die Analyse wird jeweils 1 µl der Amplifikate aus der PCR zu 12 µl Mastermix, bestehend aus 11,8 µl Formamid und 0,2 µl Größenstandard Gene Scan™ 500 Rox, in 0,5 ml Genetic Analyzer Sample Tube von Applied Biosystems pipettiert und mit einem Gummisepta verschlossen. Anschließend wird es im ABI Prism® 310 Genetic Analyzer analysiert. Der genau PCR-Ansatz und das PCR-Profil sind in Abschnitt 7.2.3. (Tabelle 8/9) detailliert angegeben.

Mit dieser Methode wurden zum Vergleich insgesamt zehn Nabelschnur- mit ihren dazugehörigen Plazentaprobe analysiert. Es stammten sechs Probenpaare aus der Behandlungs- und vier aus der Kontrollgruppe. Die Analyse wurde durchgeführt, um zu überprüfen ob die jeweilige Nabelschnur- und ihre dazugehörige Plazentaprobe der gleichen Patientin zuzuordnen sind.

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuche zur DNA-Extraktion

Um in dieser Arbeit optimale DNA-Ausbeuten zu erzielen wurden zunächst einige Vorversuche an unterschiedlichen Plazenta- und Nabelschnurproben durchgeführt.

4.1.1. Plazenta

Um die optimale DNA-Ausbeute herauszufinden wurden von einer Plazentaprobe fünf verschiedene Mengen abgewogen und extrahiert. Hierbei handelt es sich um 120, 100, 50, 25 und 12,5 mg. Die Extraktion der Proben 120, 100 und 50 mg konnte nicht zu Ende geführt werden, da sich das Gewebe über Nacht nicht vollständig lysiert hat und sich eine Flüssigkeit schleimiger Konsistenz in dem Reaktionsgefäß befand, die bei weiterer Extraktion die Filter verstopft hat. Die Proben mit 25 und 12,5 mg konnten nach Anleitung mit dem Invisorb® Spin Tissue Mini Kit extrahiert und anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft werden. Hierbei zeigte sich eine höhere DNA-Ausbeute in der 12,5 mg Probe. Um dies zu überprüfen wurden von fünf weiteren Plazentaprobe jeweils 12,5 mg in die Extraktion eingesetzt und wieder auf ein Agarosegel gegeben. Anschließend wurden die Proben mittels Realtime-PCR quantifiziert. Hierbei wurde eine ausreichende DNA-Ausbeute bestätigt, sodass für die geplanten Analysen in dieser Arbeit jeweils 12,5 mg pro Plazentaprobe eingesetzt wurden.

4.1.2. Nabelschnur

Bei den Nabelschnurproben wurde ebenfalls wie bei der Plazenta zuerst verschiedene Gewebemengen angesetzt, um die optimale DNA-Ausbeute herauszufinden. Hierbei wurden von einer Probe fünf verschiedene Mengen eingesetzt (200, 100, 50, 25 und 12,5 mg). Nach der Lyse über Nacht zeigten sich in keinem der Reaktionsgefäße Gewebereste, allerdings verstopften auch hier die Proben mit 200 mg und die Filter und konnten nicht weiter extrahiert werden. Die restlichen Proben wurden mit dem Invisorb® Spin Tissue Mini Kit zu Ende extrahiert

und anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft. Hierbei war die DNA-Menge der 50 und 25 mg Probe nicht messbar und die 12,5 mg Probe zeigte eine gute Ausbeute, sodass auch hier von fünf weiteren Nabelschnurproben jeweils 12,5 mg in die DNA-Extraktion und anschließende Gelelektrophorese eingesetzt wurden. Anders als bei der Plazenta zeigte sich hier auf dem Agarosegel keine gute DNA-Ausbeute. Deswegen wurde von diesen fünf Proben noch mal je 25 mg in die Extraktion und Gelelektrophorese eingesetzt, wobei sich eine gute DNA-Ausbeute zeigte. Um dies zu überprüfen worden sowohl die 12,5 als auch die 25 mg-Menge jeder Probe zur Quantifizierung in die Realtime-PCR eingesetzt und es wurde eine bessere Ausbeute bei den 25 mg Proben bestätigt. Für die anschließenden Versuche in dieser Arbeit wurden pro Nabelschnurprobe jeweils 25 mg eingesetzt.

4.2. Überprüfung der Probenqualität und –quantität mittels Gelelektrophorese

Es wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl das Plazenta- als auch das Nabelschnurgewebe von 61 HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie und von 61 HIV-infizierten Schwangeren ohne Therapie auf die Anwesenheit der 4977 bp Deletion mittels PCR untersucht. Vor dieser wurde die Qualität als auch die Quantität der DNA-Extrakte mittels Gelelektrophorese überprüft.

4.2.1. Probenqualität

Die Qualität der DNA von allen Extrakten wurde auf einem 1%-igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel überprüft. Hierbei zeigten sich sowohl im Plazenta- als auch im Nabelschnurgewebe keinerlei Hinweise, wie zum Beispiel ein über die ganze Laufbahn verteilter Schmier, die bei einer stark degradierten DNA vorkommen würden.

4.2.2. Probenquantität

Ebenso wurde die ungefähre Quantität aller Extrakten auf einem 1%-igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel überprüft. Hierbei sind die unterschiedlichen DNA-Mengen jeweils innerhalb der verschiedenen Plazenta- und Nabelschnurproben auffällig (Abb.7 und Abb.8). Beim Vergleich der Plazenta- und Nabelschnurextrakte

wird deutlich, dass die Plazentaextrakte die höchsten und die Nabelschnurextrakte die niedrigsten Quantitäten aufweisen. Es konnte allerdings in keinem Gewebe ein Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

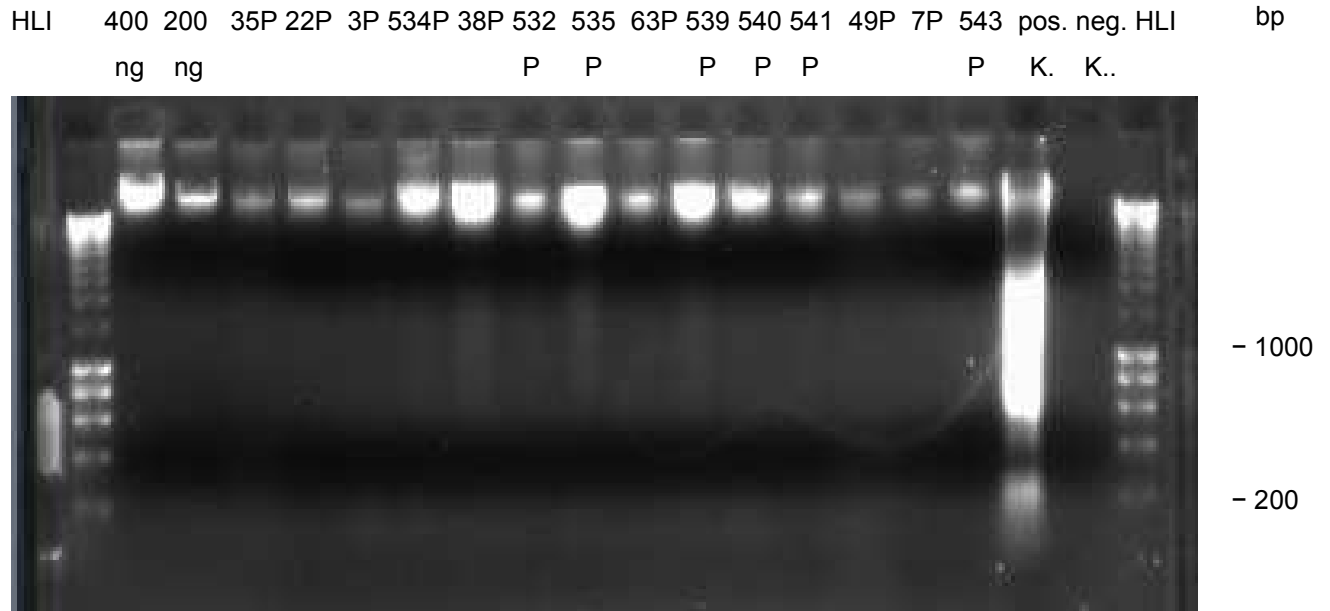


Abbildung 7: Gesamt-DNA aus Plazentagewebe von Behandlungs- und Kontrollpersonen (Abbildung nach Gelelektrophorese mit dem Geldoc von Biorad). Es wurde jeweils 5 µl der DNA auf 1%-iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich sind jeweils 5 µl der Hyperladder (HL) I, Standards von 400 und 200 ng und eine Positiv- und Negativkontrolle mitgelaufen. P=Plazentagewebe, 1-499 = Behandlungsgruppe, >500 = Kontrollgruppe.

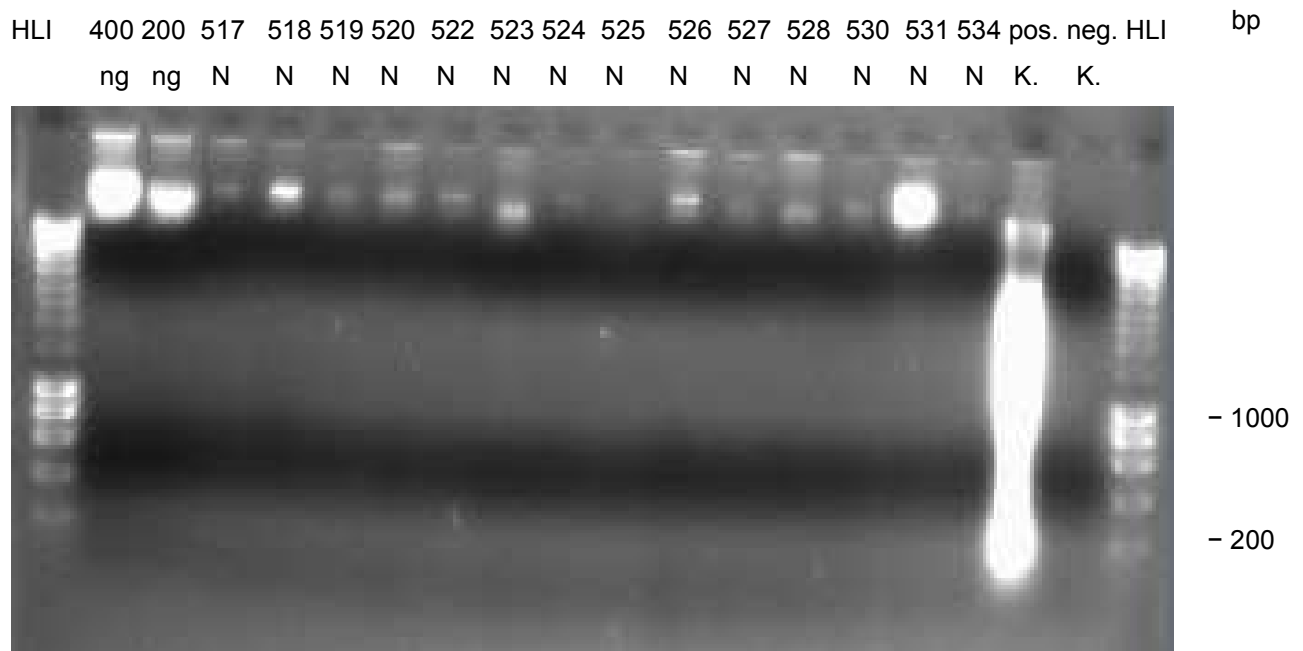


Abbildung 8: Gesamt-DNA aus Nabelschnurgewebe von Kontrollpersonen (Abbildung nach Gelelektrophorese mit dem Geldoc von Biorad). Es wurde jeweils 5 µl der DNA auf 1%-iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich sind jeweils 5 µl der Hyperladder (HL) I, Standards von 400 und 200 ng und eine Positiv- und Negativkontrolle mitgelaufen. N=Nabelschnurgewebe, >500 = Kontrollgruppe.

4.3. absolute Quantifizierung mittels Realtime-PCR

Die absoluten Quantifizierungen mittels Realtime-PCR erfolgten am ABI 7300 zum einen als Singleplex und zum anderen als Duplex.

4.3.1. Singleplex-Realtime-PCR

Die Singleplex wurde in dieser Arbeit angewendet um den nukleären DNA-Gehalt der Proben zu quantifizieren. Hierbei wird ein 98 bp Fragment des Telomerase-Gens amplifiziert, welches mit Hilfe einer NED-markierten Sonde detektiert werden kann. Die Sensitivität dieser Singleplex liegt bei ca. 12,5 pg, so dass bereits die DNA aus zwei Zellen detektiert werden kann.

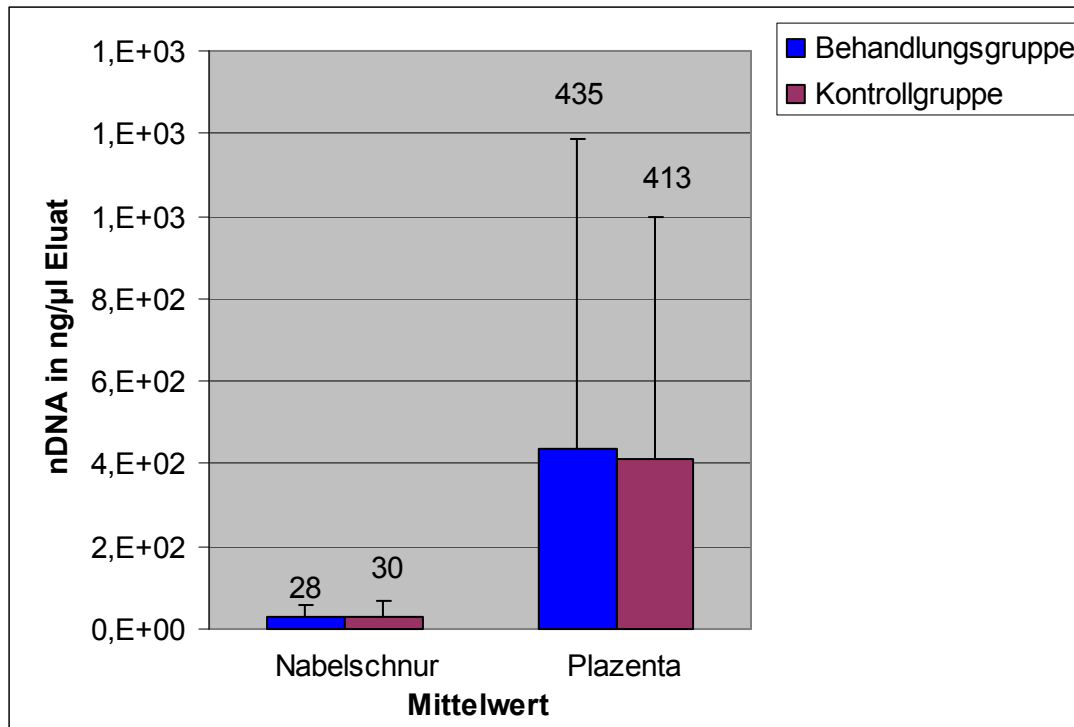


Abbildung 9: nukleärer DNA-Gehalt in ng / µl Probe (schematische Darstellung). Angegeben sind die berechneten Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus den Ergebnissen, die mit dem ABI 7300 quantifiziert wurden.

Beim Vergleich der nukleären DNA-Menge der einzelnen Gewebe wird deutlich, dass die beste DNA-Ausbeute im Plazentagewebe erzielt werden konnte (Abb.9).

Der Mittelwert der DNA-Menge pro µl lag im Nabelschnurgewebe der Behandlungsgruppe bei 27,56 ng und in der Kontrollgruppe bei 29,56 ng. Im Plazentagewebe liegt der Mittelwert in der Behandlungsgruppe bei 434,55 ng und in der Kontrollgruppe bei 413,05 ng. Somit fällt der DNA-Gehalt in der Plazenta ungefähr 14mal so hoch wie im Nabelschnurgewebe aus. Im Mann-Whitney-U-Test, dessen Ergebnisse im Abschnitt 7.3. zu finden sind, zeigt sich ein signifikanter Unterschied des nDNA-Gehaltes zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe. Sowohl innerhalb der Nabelschnur, als auch der Plazentaprobe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

4.3.2. Duplex-Realtime-PCR

Die Duplex-PCR wurde für die Quantifizierung der gesamten und deletierten mtDNA eingesetzt. Hierfür wurde ein 113 bp wildtypspezifisches und ein 122 bp deletionsspezifisches Fragment amplifiziert und mit Hilfe von unterschiedlich markierten Sonden detektiert. Die Nachweisgrenze der Duplex-PCR liegt sowohl für den Wildtyp als auch für die Deletion bei jeweils einer Kopie.

Bis auf vier Nabelschnur- und zwei Plazentaprobe konnte in allen Proben das Wildtypfragment nachgewiesen und deren Quantität genau bestimmt werden. Der Nachweis des deletionsspezifischen Fragments war nur in sehr wenigen Fällen, insgesamt in fünf Nabelschnur- und in fünf Plazentaprobe, möglich.

Beim Vergleich der wt-Kopienanzahl pro μl wird deutlich, dass im Plazentagewebe eine höhere Ausbeute an wt-Kopien erzielt werden konnte (Abb.10). Der Mittelwert der wt-Kopien pro μl liegt im Nabelschnurgewebe bei 843.720 Kopien / μl in der Behandlungs- und bei 647.812 Kopien / μl in der Kontrollgruppe. Im Plazentagewebe lag er bei 10.575.995 Kopien / μl in der Behandlungs- und bei 10.477.949 Kopien / μl in der Kontrollgruppe. Somit ist der Anteil an wt-Kopien im Plazentagewebe ungefähr 12mal so hoch wie im Nabelschnurgewebe.

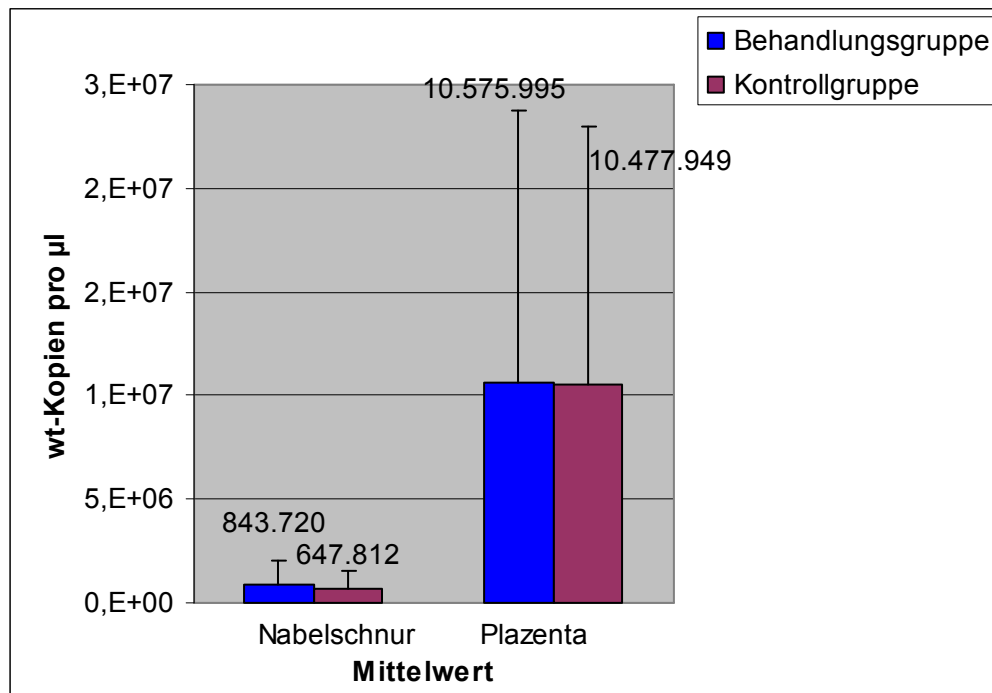


Abbildung 10: wt-Kopien pro µl Probe (schematische Darstellung). Angegeben sind die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Ergebnissen, die mit dem ABI 7300 quantifiziert wurden.

Die Unterschiede zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe fallen nach dem Mann-Whitney-U-Test, dessen Ergebnisse im Abschnitt 7.3. stehen, signifikant aus ($p = 3,55 \times 10^{-27}$). Innerhalb des Nabelschnur- und Plazentagewebes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

4.4. relative Quantifizierung mittels Duplex-PCR

Die relative Quantifizierung wurde mittels Duplex-PCR mit den Primern L15/H16 für den Wildtyp und L35/H45 für die deletierte DNA durchgeführt. Die jeweiligen Vorwärtsprimer waren FAM-markiert, so dass eine kapillarelektrophoretische Analyse am ABI Prism® 310 Genetic Analyzer möglich war. Die Nachweisgrenze des 260 bp Wildtypfragmentes liegt bei zehn Wildtypkopien und die des 238 bp Deletionsfragmentes bei einer Deletionskopie, sofern diese allein untersucht werden. Werden die Deletionskopien zusammen mit den Wildtypkopien (10^5) eingesetzt sinkt die Nachweisgrenze des Deletionsfragmentes von eins auf zehn Kopien.

In dieser Arbeit wurde eine kleine Anzahl der Proben ausgewählt um mittels Duplex-PCR die Ergebnisse der Realtime-PCR zu überprüfen. Es wurden sechs

Nabelschnurproben, jeweils drei aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe, und acht Plazentaprobe, jeweils vier aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe eingesetzt. Des Weiteren wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle, bei der es sich um Skelettmuskel, der für eine hohe Deletionsanzahl bekannt ist, handelt, eingesetzt. Zusätzlich wurden in jedem Lauf Standards sowohl für den Wildtyp (10^6) als auch für die Deletion (10^3 , 10^2 , 10, 1) mitgeführt.

In allen untersuchten Proben konnte das 260 bp Wildtypfragment nachgewiesen werden. Die Detektion des 238 bp deletionspezifischen Fragmentes war in keiner der 14 Proben möglich. Die Proben wurden in der Duplex-PCR mit 30 ng an DNA-Gehalt eingesetzt. Insgesamt wurden die Ergebnisse der Realtime-PCR bezüglich dieser Proben bestätigt.

Die relative Quantifizierung am ABI Prism® Genetic Analyzer erfolgt anhand relativer Einheiten, die von der Software aus dem Flächeninhalt und der Höhe des jeweiligen Peaks berechnet werden (Abb.11). Hierbei wird der Flächeninhalt des Wildtypfragmentes gleich 100% gesetzt und mit dem der 4977 bp Deletion in Relation gebracht.

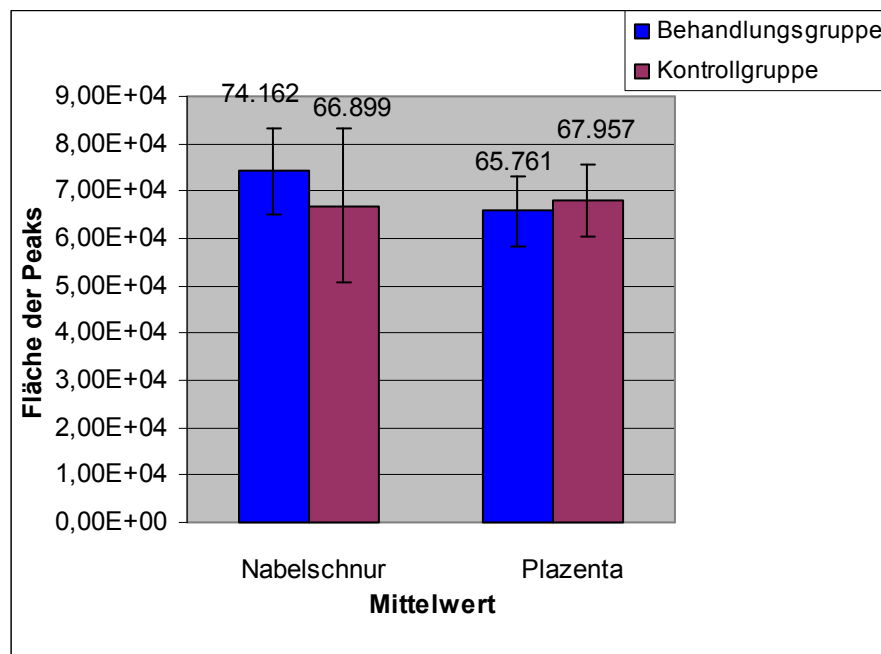


Abbildung 11: Fläche der Peaks des mtDNA-Gehalts in Plazenta- und Nabelschnurgewebe von Behandlungs- und Kontrollgruppe (schematische Darstellung). Analysiert wurde das Plazenta- von jeweils vier aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe und das Nabelschnurgewebe von jeweils drei aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe mittels Duplex-PCR mit anschließender kapillarelektrophoretischer Analys am ABI Prism® 310.

4.5. Nachweis polymorpher STRs

Die Powerplex-PCR ist eine Multiplex-PCR bei der 15 polymorphe „short tandem repeats“ und die geschlechtsspezifischen Fragmente amplifiziert werden um anhand der individuellen Merkmalsmuster die Abstammung eines Gewebes zu untersuchen. Die Nachweisgrenze liegt insgesamt bei 12,5 pg / μ l, allerdings fallen ab 50 pg / μ l einzelne Allele aus.

In dieser Arbeit wurde eine geringe Menge an Proben ausgewählt um die Abstammung der Nabelschnur- und der dazugehörigen Plazentaprobe vom gleichen Individuum zu überprüfen. Insgesamt wurden zehn Nabelschnur- mit ihren dazugehörigen Plazentaprobe analysiert, wovon jeweils sechs Proben aus der Behandlungs- und vier Proben aus der Kontrollgruppe stammen. In allen Proben zeigte sich in allen untersuchten Fällen eine 100%-ige gleiche Identität zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe. Somit stammt in allen Fällen die jeweilige Nabelschnur- und Plazentaprobe von der gleichen HIV-infizierten Mutter ab und es handelt sich jeweils um den kindlichen Teil der Plazenta.

4.6. Zellzahl und mtDNA-Gehalt

Aus den ermittelten Daten der Single- und Duplex-PCR konnte zum einen die Zellzahl in den Eluaten und zum anderen die Kopienzahl pro Zelle berechnet werden.

4.6.1. Zellzahl pro μ l in Nabelschnur und Plazenta

Für die Berechnung der Zellzahl pro μ l wurde die DNA-Menge pro μ l durch die DNA-Menge von 0,0066 ng pro diploider Zelle geteilt. Die Abbildung 12 zeigt deutlich, dass zwischen Nabelschnur und Plazenta grundsätzlich ein großer Unterschied in der Anzahl der Zellen vorliegt.

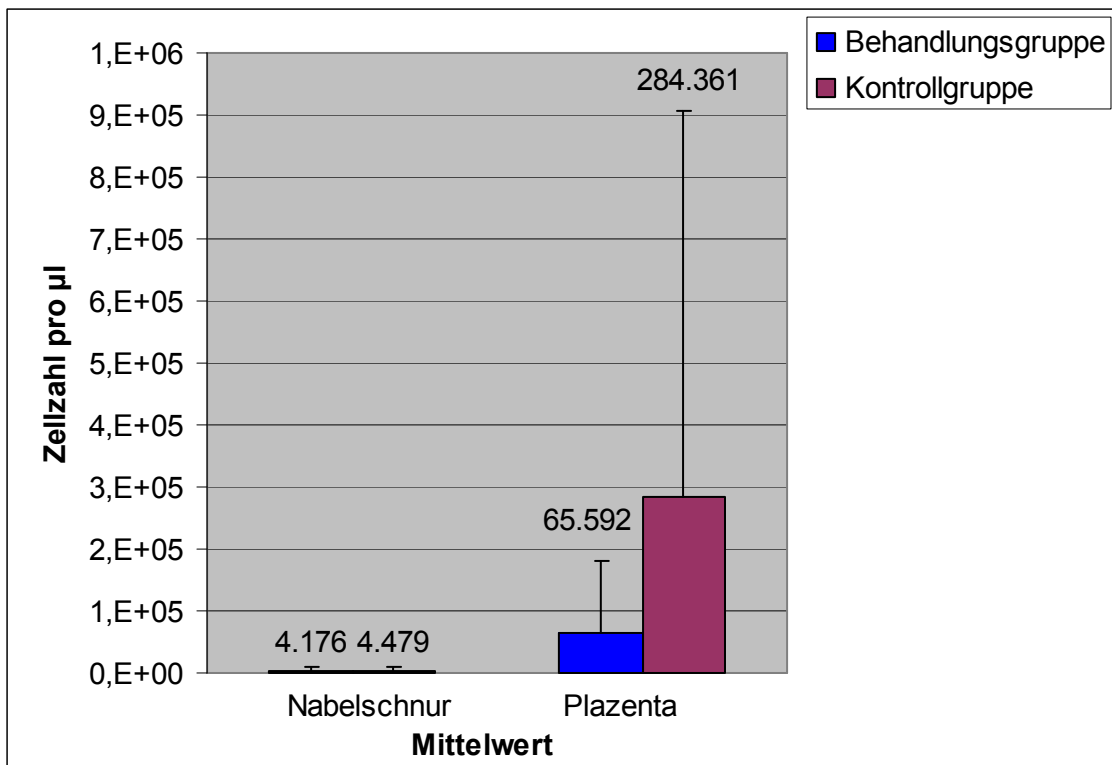


Abbildung 12: Anzahl der Zellen pro µl (schematische Darstellung). Angegeben sind die durchschnittlichen Zellzahlen pro µl in Nabelschnur und Plazenta und deren Standardabweichungen, die sich aus den Ergebnissen der Duplex-Realtime-PCR berechnen ließen.

Das Nabelschnurgewebe weist mit durchschnittlich 4.176 – 4.479 Zellen die geringste Anzahl auf und zeigt im Gewebe der Behandlungsgruppe eine geringe Abnahme. In dem Eluat der Plazenta konnte eine bis zu 63fach höhere Zellanzahl pro µl nachgewiesen werden. Insgesamt liegt die Zellzahl in der Plazenta durchschnittlich bei 65.592 – 284.361 Zellen pro µl und es wird eine Abnahme der Zellen im Gewebe der Behandlungsgruppe gezeigt.

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 4,91 \times 10^{-31}$) zwischen dem Nabelschnur- und Plazentagewebe. Innerhalb des Nabelschnurgewebes zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,53$) zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe, wohingegen sich im Plazentagewebe ein signifikanter Unterschied ($p = 3,99 \times 10^{-3}$) zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe bestätigte.

4.6.2. Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle in Nabelschnur und Plazenta

Die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle konnte aus den Ergebnissen Duplex-Realtime-PCR und der Quantifizierung der nDNA mit dem ABI 7300 ermittelt werden, da die Zellzahl und die Menge an Wildtyp-mtDNA bekannt war. Wie in der Abbildung 13 ersichtlich befinden sich in der Behandlungsgruppe im Plazentagewebe weitaus mehr mtDNA-Kopien als im Nabelschnurgewebe. In der Kontrollgruppe hingegen zeigt sich eine ähnliche Anzahl an mtDNA-Kopien in beiden Geweben.

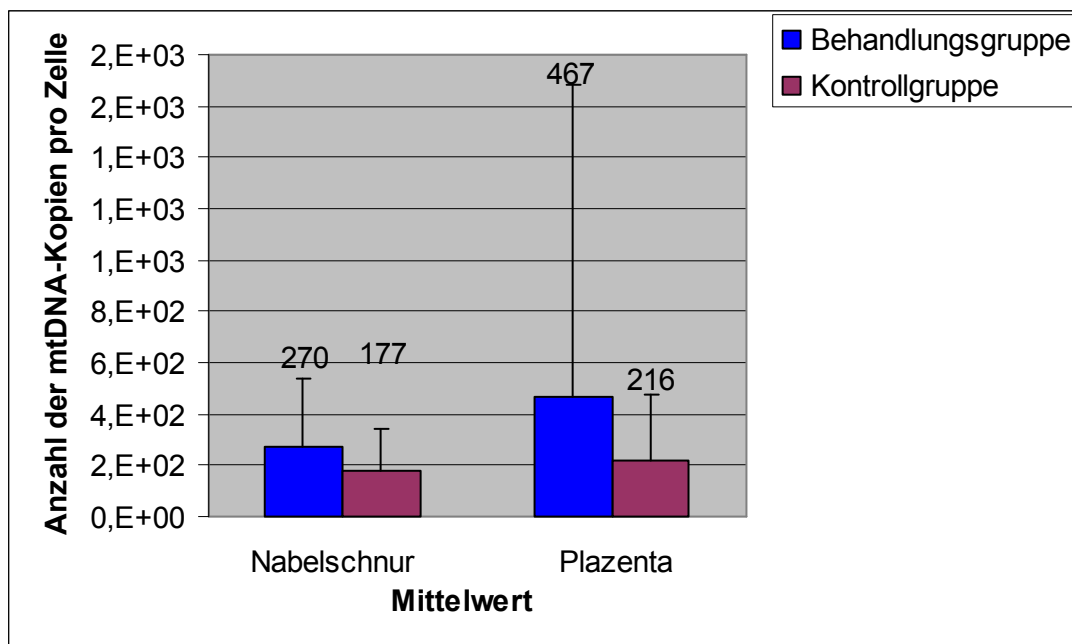


Abbildung 13: mtDNA Kopienanzahl pro Zelle im Nabelschnur- und Plazentagewebe von HIV-infizierten Schwangeren mit und ohne AZT-Therapie (schematische Darstellung). Angegeben sind die durchschnittlichen mtDNA Kopienanzahlen pro Zelle und deren Standardabweichungen, die sich aus den Ergebnissen der Duplex-Realtime-PCR und der Quantifizierung am ABI 7300 berechnen lassen.

Sowohl im Nabelschnur-, als auch im Plazentagewebe besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe, dies wird auch durch den Mann-Whitney-U-Test belegt. In der Nabelschnur zeigt sich in der Behandlungsgruppe eine durchschnittliche Kopienanzahl pro Zelle der mtDNA von 270 und in der Kontrollgruppe 177 ($p=0,039$). Im Plazentagewebe befinden sich in der Behandlungsgruppe durchschnittlich 467 Kopien pro Zelle und in der Kontrollgruppe 216 ($p=0,0089$). Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Nabelschnur- und Plazentagewebe ($p=0,81$).

4.6.3. Behandlungsgruppe

4.6.3.1. Zellzahl pro μl in Nabelschnur und Plazenta

In der Behandlungsgruppe handelt es sich um HIV-infizierte Schwangere mit AZT-Therapie. Hierbei zeigt sich ein großer Unterschied bezüglich der Zellzahl pro μl Probe zwischen Nabelschnur und Plazentagewebe.

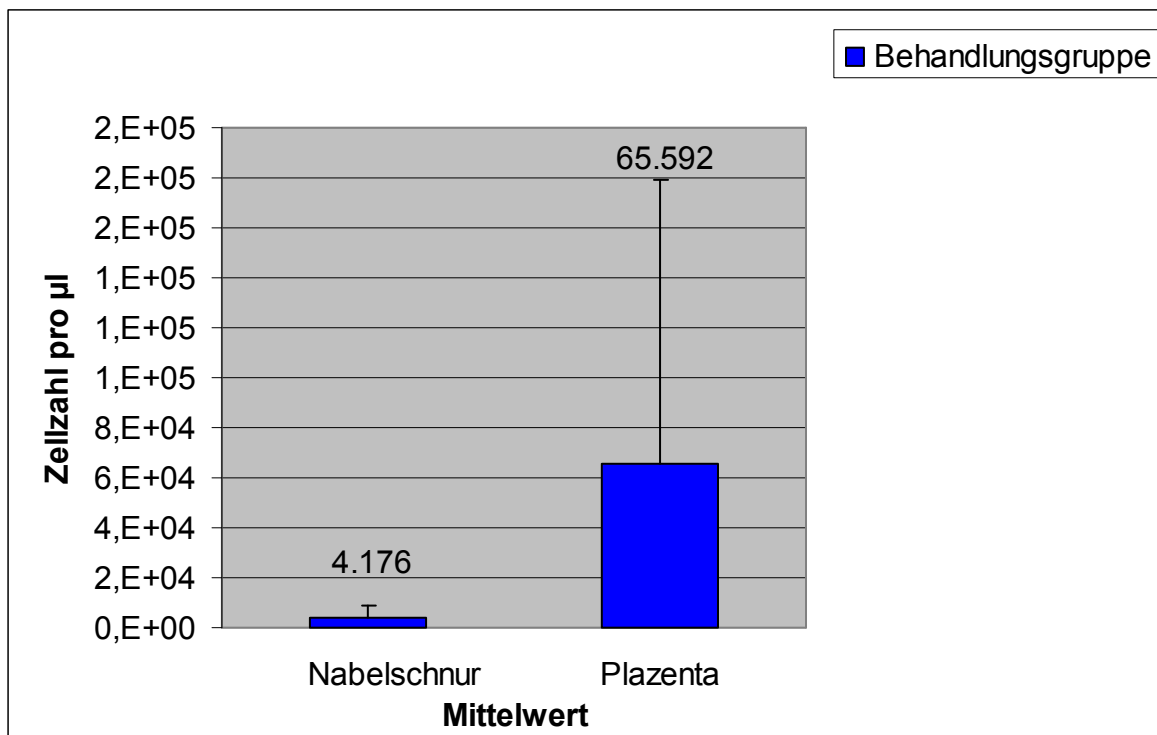


Abbildung 14: Anzahl der Zellen pro μl in Nabelschnur- und Plazentagewebe innerhalb der Behandlungsgruppe (schematische Darstellung). Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl an Zellen pro μl und deren Standardabweichung, die sich aus den Ergebnissen der Duplex-Realtime-PCR berechnen ließ.

Das Nabelschnurgewebe zeigt mit durchschnittlich 4.176 Zellen pro μl eine weitaus geringere Zellzahl als das Plazentagewebe mit 65.592 Zellen pro μl (Abb.14). Insgesamt ist die Zellzahl in der Plazenta ungefähr 16mal so hoch wie in der Nabelschnur. Dies wird durch den Mann-Whitney-U-Test bestätigt, bei dem hier ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde.

4.6.3.2. Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle in Nabelschnur und Plazenta

Wie in Abbildung 15 ersichtlich ist die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe innerhalb der Behandlungsgruppe ziemlich ähnlich mit einer etwas höheren Anzahl im Plazentagewebe.

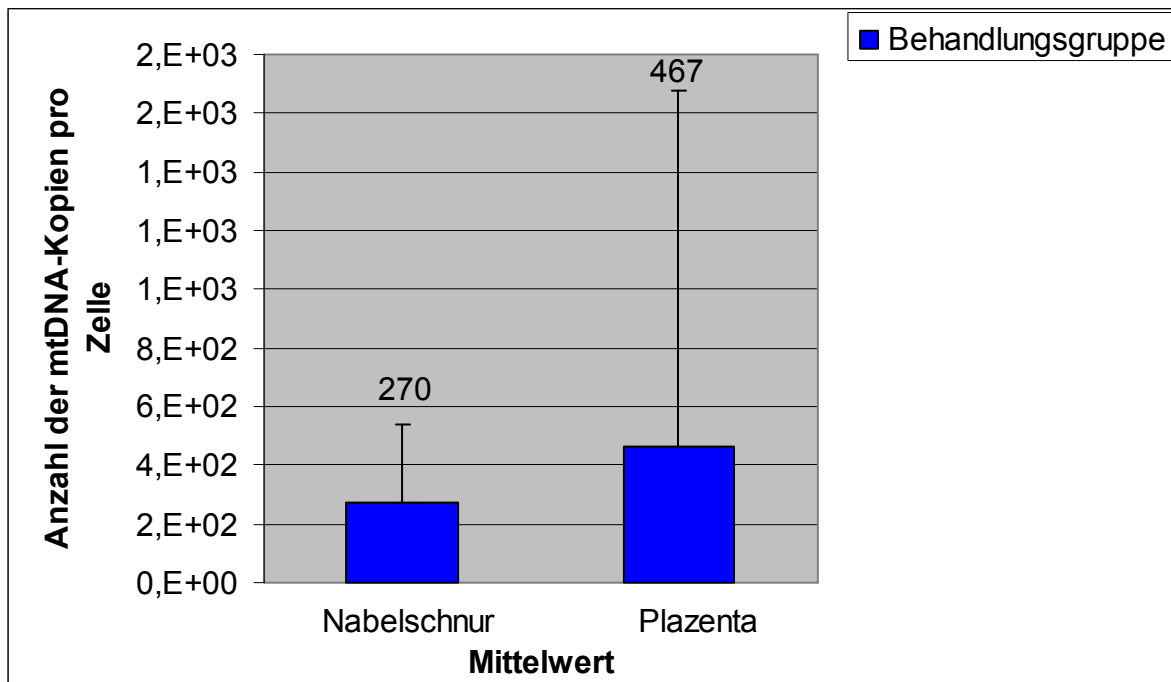


Abbildung 15: mtDNA Kopienanzahl pro Zelle im Nabelschnur- und Plazentagewebe in der Behandlungsgruppe (schematische Darstellung). Angegeben sind die durchschnittlichen mtDNA Kopienanzahlen pro Zelle und deren Standardabweichungen, die sich aus den Ergebnissen der Duplex-Realtime-PCR und der Quantifizierung am ABI 7300 berechnen lassen.

Der Mittelwert der Nabelschnur liegt bei 270 mtDNA-Kopien pro Zelle und im Plazentagewebe bei 467 Kopien (Abb.15). Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

4.6.4. Kontrollgruppe

4.6.4.1. Zellzahl pro µl in Nabelschnur und Plazenta

In der Kontrollgruppe handelt es sich um HIV-infizierte Schwangere die keine antiretrovirale Therapie erhalten haben. Hierbei besteht, wie in Abbildung 16 erkennbar, ein deutlicher Unterschied zwischen Nabelschnur und Plazenta.

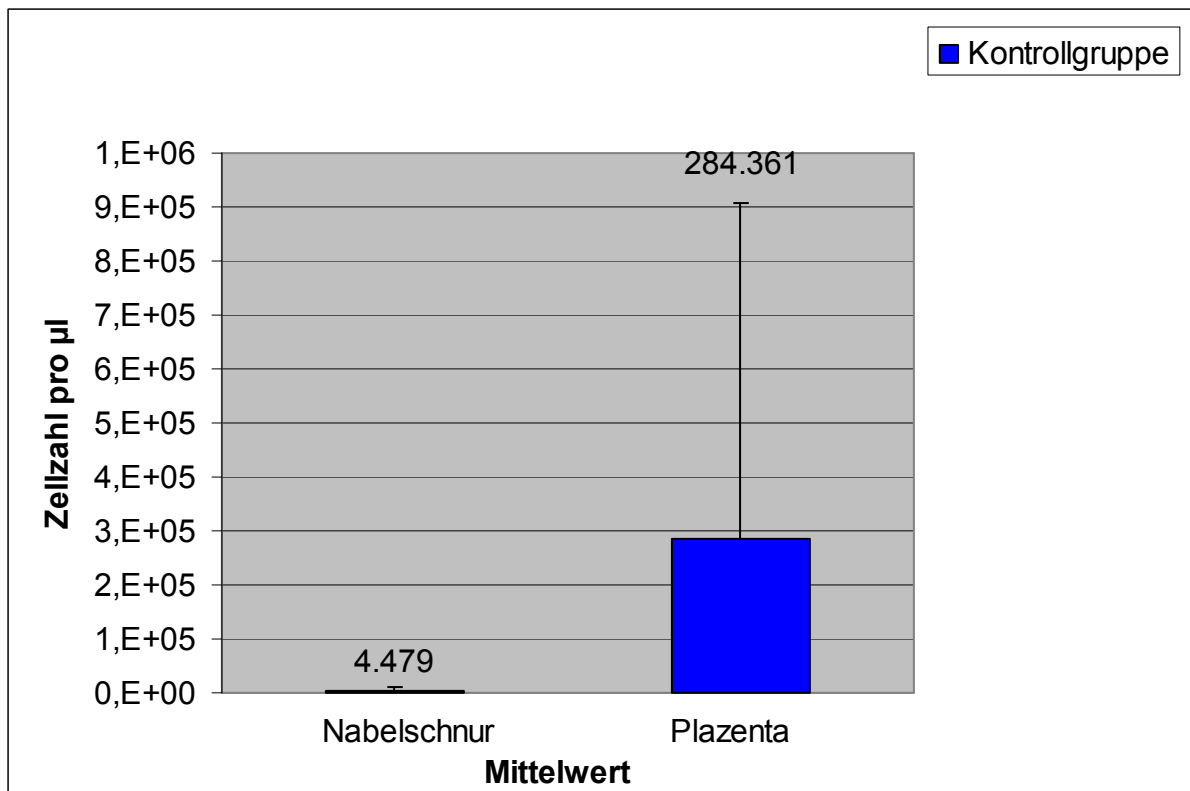


Abbildung 16: Anzahl der Zellen pro µl in Nabelschnur- und Plazentagewebe innerhalb der Kontrollgruppe (schematische Darstellung). Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl an Zellen pro µl und deren Standardabweichung, die sich aus den Ergebnissen der Duplex-Realtime-PCR berechnen ließ.

In der Nabelschnur befinden sich durchschnittlich 4.479 Zellen pro µl Probe, während in der Plazenta 284.361 Zellen pro ml sind. Somit ist die Zellzahl in der Plazenta ungefähr 63mal höher als in der Nabelschnur. Auch der Mann-Whitney-U-Test bestätigt einen signifikanten Unterschied.

4.6.4.2. Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle in Nabelschnur und Plazenta

Die Abbildung 17 zeigt, dass die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle im Nabelschnur- und Plazentagewebe innerhalb der Kontrollgruppe ungefähr gleich sind.

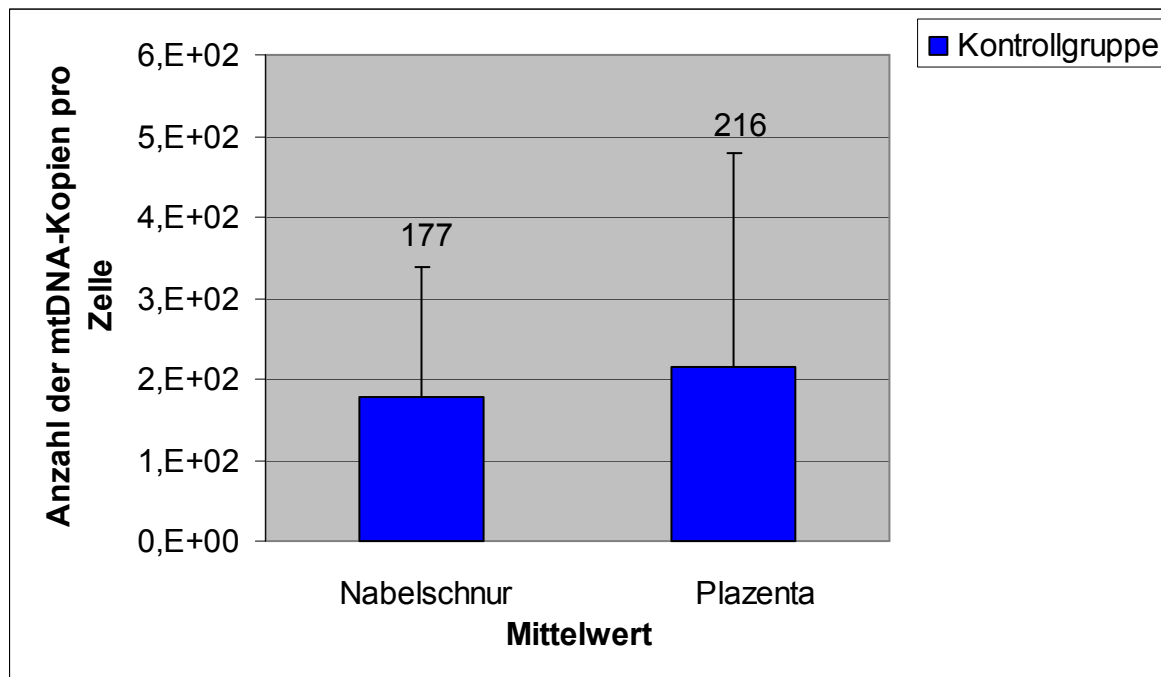


Abbildung 17: mtDNA Kopienanzahl pro Zelle im Nabelschnur- und Plazentagewebe in der Kontrollgruppe (schematische Darstellung). Angegeben sind die durchschnittlichen mtDNA Kopienanzahlen pro Zelle und deren Standardabweichungen, die sich aus den Ergebnissen der Duplex-Realtime-PCR und der Quantifizierung am ABI 7300 berechnen lassen.

Das Nabelschnurgewebe hat durchschnittlich 177 mtDNA-Kopien pro Zelle und das Plazentagewebe 216 Kopien, somit zeigt sich eine etwas höhere Anzahl an mtDNA-Kopien in der Plazenta. Allerdings ist der Unterschied laut Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant.

4.7. Die 4977 bp Deletion der mtDNA bei HIV-infizierten Schwangeren mit und ohne AZT-Therapie

Zusätzlich zur Deletion wurde die gesamte nukleäre DNA und die mtDNA bestimmt. Dadurch lässt sich der Anteil deletierter DNA in den Proben bestimmen.

4.7.1. Die 4977 bp Deletion in der Behandlungsgruppe

In der Behandlungsgruppe wurden sowohl in der Nabelschnur als auch in der Plazenta in jeder Probe Wildtypkopien gefunden. Die 4977 bp Deletion ließ sich nur im Plazentagewebe nachweisen, allerdings konnte sie nur in fünf der insgesamt 61 Proben detektiert werden.

Abbildung 18 zeigt den prozentualen Anteil der deletierten mtDNA an der gesamten mtDNA.

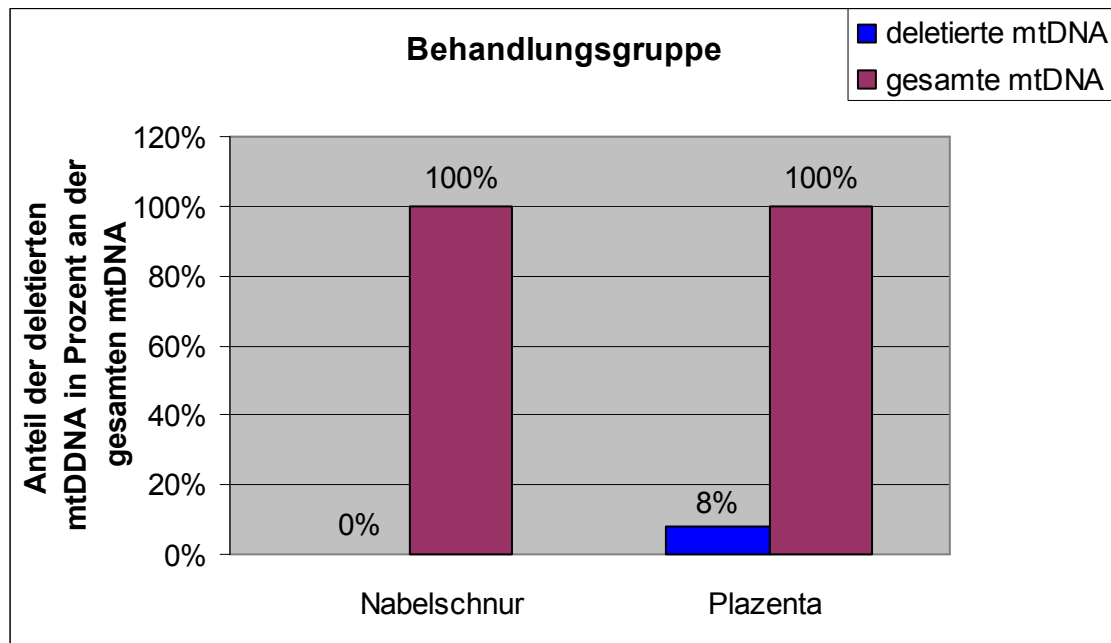


Abbildung 18: Anteil der Proben in Prozent, in denen deletierte mtDNA nachgewiesen wurde im Verhältnis zur gesamten Behandlungsgruppe (schematische Darstellung). Analysiert wurde das Nabelschnur- und Plazentagewebe von 61 Personen aus der Behandlungsgruppe mittels Duplex-Realtime-PCR am ABI 7300.

Es besteht eindeutig ein Unterschied zwischen Nabelschnur und Plazenta. Während in der Nabelschnur keine Deletion vorliegt, wurde in der Plazenta in 8,19 % der Proben eine Deletion gefunden. Allerdings zeigt sich dieser Unterschied im Mann-Whitney-U-Test als nicht signifikant.

Insgesamt wurde in den fünf Proben, die deletierte mtDNA enthalten, nur eine geringe Menge der 4977 bp Deletion nachgewiesen. Diese wird in Abbildung 19 deutlich, welche die Deletionskopien pro μl der fünf Proben darstellt.

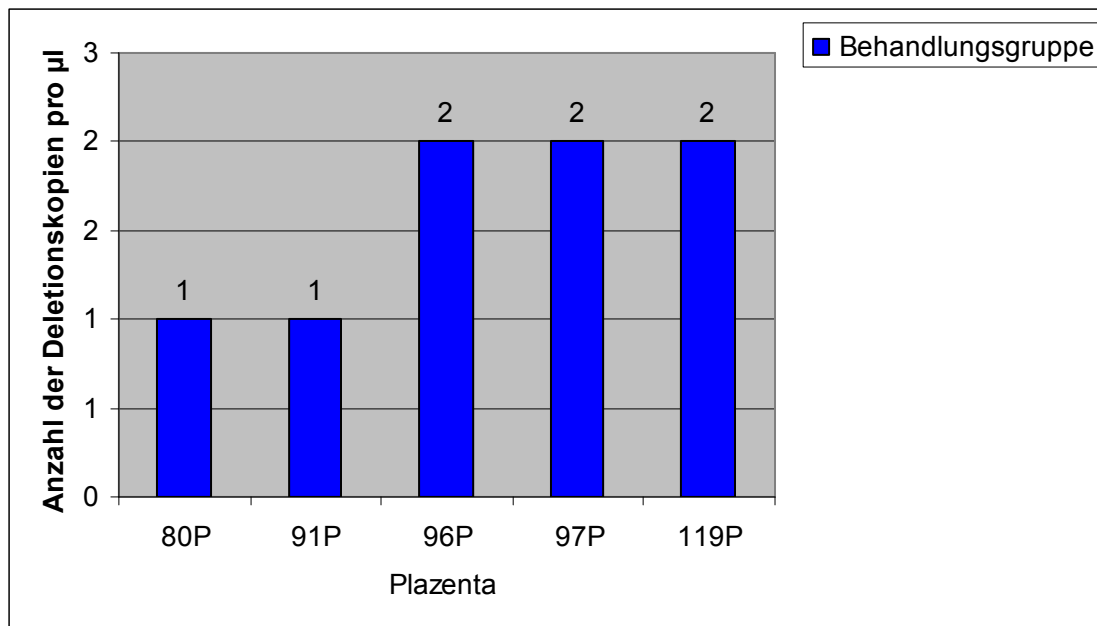


Abbildung 19: Anzahl der Deletionskopien pro µl im Plazentagewebe innerhalb der Behandlungsgruppe (schematische Darstellung). Angegeben ist die Analyse der Deletion mittels Duplex-Realtime-PCR der fünf Proben, in denen deletierte DNA gefunden wurde. Die Nummern stehen für die jeweilige Person und das P für Plazentagewebe.

In den Plazentaprobe liegt die maximale Detektion der 4977 bp Deletion bei zwei Kopien pro µl, was eine sehr geringe Anzahl ist.

4.7.2. Die 4977 bp Deletion in der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurde sowohl im Nabelschnur- als auch im Plazentagewebe in jeder Probe Wildtypkopien gefunden. Die 4977 bp Deletion wurde nur in der Nabelschnur detektiert und hier konnte sie allerdings auch nur in fünf der insgesamt 61 untersuchten Proben nachgewiesen werden.

In der Abbildung 20 wird der prozentuale Anteil der deletierten mtDNA an der gesamten mtDNA gezeigt.

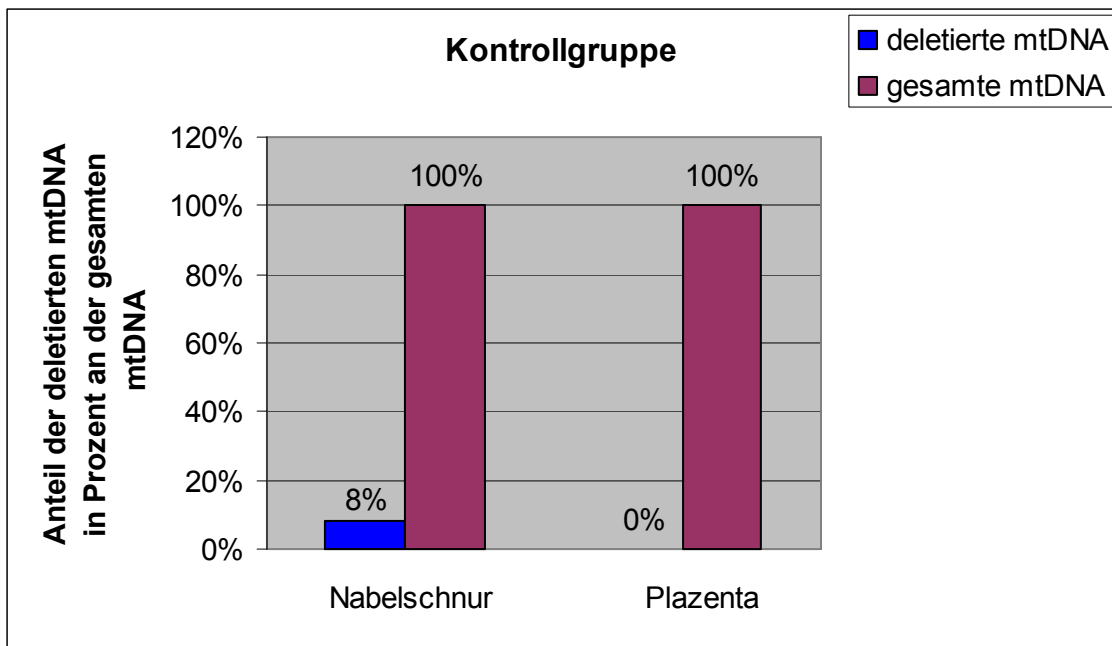


Abbildung 20: Anteil der Proben in Prozent, in denen deletierte mtDNA nachgewiesen wurde im Verhältnis zur gesamten Kontrollgruppe (schematische Darstellung). Analysiert wurden die Nabelschnur und die Plazenta von 61 Personen aus der Kontrollgruppe mittels Duplex-Realtime-PCR am ABI 7300.

Es zeigt sich eindeutig ein Unterschied zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe. Insgesamt wurde in 8,19 % der Nabelschnurproben eine Deletion gefunden, während in der Plazenta keine einzige Deletion detektiert werden konnte. Der Unterschied ist allerdings laut Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant.

Insgesamt wurde die Deletion nur in fünf Nabelschnurproben nachgewiesen, welche in Abbildung 21 dargestellt sind.

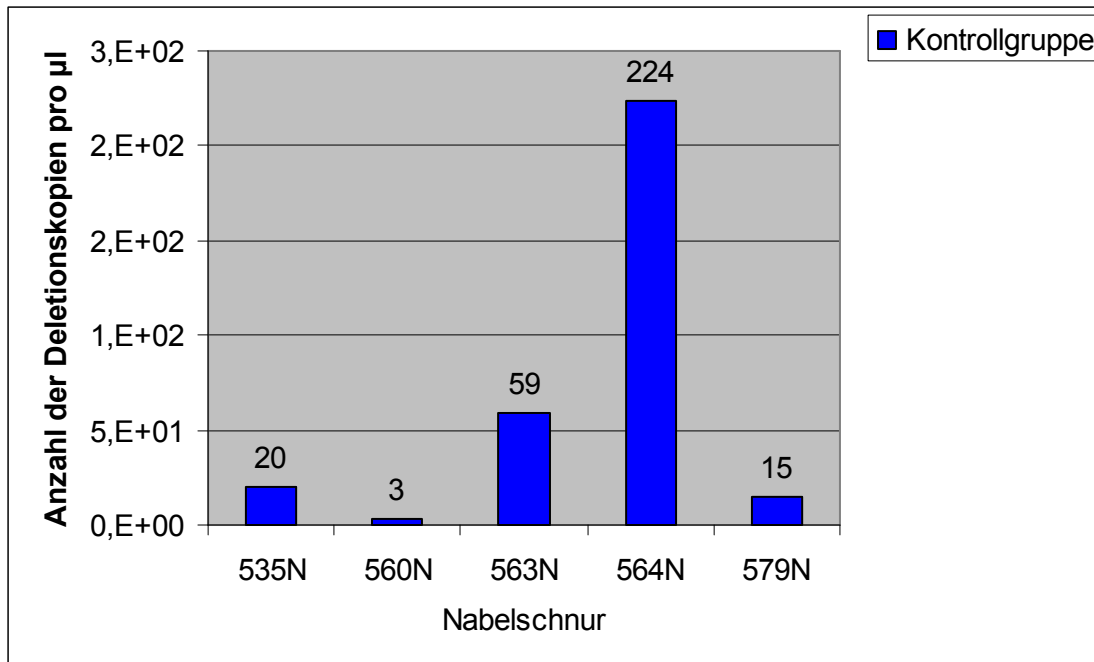


Abbildung 21: Anzahl der Deletionskopien pro µl im Nabelschnurgewebe innerhalb der Kontrollgruppe (schematische Darstellung). Angegeben ist die Analyse der Deletion mittels Duplex-Realtime-PCR der fünf Proben, in denen deletierte DNA gefunden wurde. Die Nummern stehen für die jeweilige Person und das N für Nabelschnurgewebe.

Die maximale Anzahl der detektierten 4977 bp Deletion liegt im Nabelschnurgewebe bei 224 Kopien pro µl und die geringste Menge liegt bei drei Kopien pro µl. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Proben.

4.7.3. Die 4977 bp Deletion in Plazenta und Nabelschnur

Innerhalb der Plazenta konnte die 4977 bp Deletion nur in fünf Proben der Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass der deletierte Anteil der Plazenta in der Behandlungsgruppe 8,19 % entspricht. In der Kontrollgruppe wurde keine Deletion detektiert. Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen sehr gering. dies wird auch durch den Mann-Whitney-U-Test bestätigt, der hier keinen signifikanten Unterschied anzeigt ($p = 0,43$).

Im Nabelschnurgewebe wurde die 4977 bp Deletion nur in fünf Proben der Kontrollgruppe, welches einem Anteil von 8,19 % deletierter Proben entspricht, und nicht in der Behandlungsgruppe detektiert. Dieser Unterschied zeigt sich ebenfalls im Mann-Whitney-U-Test als nicht signifikant ($p = 0,67$).

5. DISKUSSION

5.1. Probenauswahl

Die untersuchten Proben wurden alle im Rahmen eines Forschungsprojektes der Charité in Berlin gewonnen. Sie wurden alle in Tansania in der Mbeya-Region im Kyela Distrikt Krankenhaus gleich nach der Geburt entnommen. Es handelt sich bei allen Proben um HIV-infizierte Mütter, allerdings wurden die Mütter in der Behandlungsgruppe mit AZT behandelt, während die Mütter in der Kontrollgruppe kein antiretrovirales Medikament erhalten haben. Die Frauen in der Behandlungs- und Kontrollgruppe entstammen alle dem gleichen Einzugsgebiet. Über das Alter der Mütter, sowie über mögliche Nebenerkrankungen und zusätzliche Medikamenteneinnahme, welche die mtDNA-Menge beeinflussen können ist nichts bekannt. Bei allen Frauen, die für diese Arbeit ausgewählt wurden, waren sowohl eine Nabelschnur- als auch eine dazugehörige Plazentaprobe vorhanden, welche beide untersucht wurden.

5.2. Probenaufbewahrung und Transport

Insgesamt wurden von jeder Frau je zwei kleine Stücke Plazenta und Nabelschnur nach Geburt entnommen. Die Proben wurden in „Cryovials“ aufbewahrt und normalerweise anschließend bei -20°Celsius eingefroren. Allerdings konnten nicht alle Proben direkt eingefroren werden. Einige wurden deswegen vor allem am Wochenende oft im Kühlschrank aufbewahrt bis sie eingefroren werden konnten. Bis die Gewebeproben entnommen wurden, waren einige Proben längere Zeit ohne Kühlung gelagert worden, was gerade bei den heißen Temperaturen in Tansania zur einer sehr schnellen Degradation der Gewebe führen kann. Die Proben waren auch makroskopisch sehr unterschiedlich. Gerade bei der Plazenta sahen einige Proben sehr vertrocknet aus, was durch eine längere Lagerung ohne Kühlung passiert sein könnte, während andere Proben sehr blutgetränkt erschienen sind. Vor allem der starke Blutgehalt in manchen Plazentaproben kann die Anzahl der mtDNA stark beeinflusst haben.

Insgesamt wurden alle Proben innerhalb von ungefähr einem Jahr gewonnen und in Tansania eingefroren aufbewahrt bis sie alle komplett mit einem Sondertransport per Flugzeug im Herbst 2009 nach Deutschland gebracht wurden. Die Proben sind dann im Januar 2010 im rechtsmedizinischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel eingetroffen. Somit besteht auch teilweise ein großer Unterschied bezüglich der Dauer, die die Proben eingefroren waren und bis sie verarbeitet wurden. Dies kann auch zu einer unterschiedlichen Degradation der Gewebe führen, welche möglicherweise Einfluss auf den DNA-Erhalt haben könnte.

5.3. DNA-Extraktion

In dieser Arbeit wurde die DNA sowohl aus der Nabelschnur als auch aus der Plazenta mit dem Invisorb® Spin Tissue Mini Kit von Invitek extrahiert. Hierbei wurden für die Plazenta je Probe 12,5 mg und für die Nabelschnur je 25 mg in die Extraktion eingesetzt, da diese Mengen in den Vorversuchen die beste DNA-Ausbeute gezeigt haben. Beide Gewebe konnten auf die gleiche Art und Weise extrahiert werden. In der Gelelektrophorese zeigt sich ein großer Unterschied bezüglich des DNA-Gehalts der Proben innerhalb eines Gewebes. Aufgrund dessen mussten einige Proben zwischen 1:10 bis 1:1000 verdünnt werden, bevor sie in die absolute Quantifizierung mittels Realtime-PCR am ABI 7300 eingesetzt werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte aus allen Proben mit Hilfe des Invisorb® Spin Tissue Mini Kit ausreichend DNA gewonnen werden um diese hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese zu untersuchen. Insgesamt zeigt sich eine signifikant höhere DNA-Ausbeute im Plazentagewebe. Dies erklärt sich einerseits durch den höheren Gehalt an Zellen im Plazentagewebe gegenüber Nabelschnurgewebe und könnte andererseits auch daran liegen, dass in vielen Plazentaprobe sehr starke Blutbeimengungen vorhanden waren, was bei den Nabelschnurproben nicht vorgekommen ist.

5.4. Quantifizierung der nukleären sowie der gesamten und spezifisch deletierten mtDNA

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Quantifizierungen durchgeführt, die in den folgenden Abschnitten genau diskutiert werden. Es wurde zum einen die nDNA und zum anderen die Wildtyp- und die 4977 bp mtDNA in den Proben ermittelt, deren Quantifizierung absolut und zu einem geringen Teil auch relativ erfolgte.

5.4.1. absolute Quantifizierung der nukleären DNA

Die Quantifizierung der nDNA in den Proben erfolgte mittels Singleplex-Realtime-PCR am ABI 7300. Es konnte sowohl in allen Nabelschnur- als auch in allen Plazentaprobe nDNA nachgewiesen werden.

Bei der angewendeten Singleplex-Realtime-PCR wird ein 98 bp langes spezifisches Fragment des Telomerase-Gens amplifiziert und analysiert. Hierbei wird eine Sensitivität von 12,5 pg erreicht, was ungefähr der DNA-Menge von zwei Zellen entspricht. Somit ist dieses Verfahren auch bei kleinsten Mengen an DNA, als auch bei stark degradiertem Material einsetzbar. Dies wird in dieser Arbeit dadurch bestätigt, dass auch in makroskopisch sehr vertrockneten Gewebeprobe, welche eventuell längere Zeit bei Raumtemperatur herumlagen bevor sie eingefroren werden konnten, nukleäre DNA quantifiziert werden konnte.

5.4.2. absolute und relative Quantifizierung der mitochondrialen DNA und der 4977 bp Deletion

In der vorliegenden Arbeit war einerseits von Interesse in welcher Menge die mtDNA vorliegt und andererseits, ob die 4977 bp Deletion vorhanden ist und in welcher Quantität sie im Nabelschnur- und Plazentagewebe von HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie und von HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie nachgewiesen werden kann. Um dies herauszufinden wurde zum einen die Gesamtmenge und zum anderen die Menge an deletierter mtDNA quantifiziert. Hierfür wurde sowohl eine absolute Quantifizierung aller 244 Proben am ABI 7300

als auch eine relative Quantifizierung von acht Plazenta- und sechs Nabelschnurproben am ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer durchgeführt.

Beide Methoden sollen an dieser Stelle einander gegenübergestellt werden. Hinsichtlich der Nachweisgrenze zeigen beide Verfahren eine hohe Sensitivität. Hierbei fällt die absolute Quantifizierung bei der Amplifizierung der Wildtyp-mtDNA um eine Potenz sensitiver aus. Bei der Quantifizierung der spezifisch deletierten mtDNA zeigen beide Methoden eine Sensitivität bis zu einer Kopie. In Bezug auf die Nachweisgrenze ist die Analyse mittels absoluter Quantifizierung vorzuziehen.

Bei der absoluten Quantifizierung der insgesamt 244 Proben mittels ABI 7300 konnte in 238 Fällen (97,5 %) die Wildtyp-mtDNA nachgewiesen werden, wobei die Detektion der 4977 bp Deletion nur in zehn Fällen (4,1 %) möglich war. Bei der relativen Quantifizierung von den 14 ausgewählten Proben konnte in allen 14 Fällen (100 %) die Wildtyp-mtDNA und in keinem einzigen Fall die spezifisch deletierte mtDNA detektiert werden. Hierdurch werden die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung in diesen 14 ausgewählten Proben bestätigt.

Ein Vorteil der Duplex-Realtime-PCR liegt in der genauen Quantifizierung, da die Software mit Hilfe der Standards die genauen Mengen an Wildtyp- und deletierter mtDNA extrapolieren kann. Während in der Duplex-PCR nur relative Verhältnisse ermittelt werden, indem die Flächeninhalte der Peaks in Relation zueinander gesetzt werden.

Ein weiterer Vorteil der Duplex-Realtime-PCR ist der geringere Zeitaufwand. Hierbei werden alle 96 Proben gleichzeitig auf eine Thermo-Fast® 96 Detection Platte pipettiert und parallel vom ABI 7300 amplifiziert und analysiert. Während bei der relativen Quantifizierung die Proben zunächst für drei Stunden im Cycler amplifiziert werden und erst anschließend am ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer kapillarelektrophoretisch untersucht werden. Dabei wird jede Probe für 24 Minuten analysiert und in Form eines Elektropherogramms dargestellt, welches anschließend ausgewertet werden muss.

Bezüglich des finanziellen Aspekts, der im Bereich der Forschung eine Rolle spielt ist die Duplex-PCR eindeutig im Vorteil, denn für die absolute Quantifizierung muss aufgrund der teuren Sonden, die für die Realtime-PCR benötigt werden, weit mehr ausgegeben werden. Man muss also abwägen ob die relative Quantifizierung ausreichend ist oder genaue Angaben benötigt werden. Allerdings darf man nicht vergessen, dass die Duplex-Realtime-PCR im Vergleich zur Singleplex-Realtime-

PCR einen geringeren Kostenfaktor aufweist, da in einer PCR zwei Fragmente untersucht und somit die Reagenzien nur einmal verbraucht werden.

5.5. Gibt es einen Unterschied im Plazentagewebe von HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und von HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese?

Die Wirkung von Azidothymidin führt in vielen Fällen zur Depletion der mitochondrialen DNA. Des Weiteren kann es zu einer Erhöhung des oxidativen Stress und der Superoxide führen. Kline et al. 2009 fanden heraus, dass die Behandlung von HIV-infizierten Personen mit AZT zu einer Erhöhung des oxidativen Stress und der Superoxide sowohl in menschlichen Endothelzellen der Aorta als auch in menschlichen Leberzellen führt gegenüber gesunden Personen. Eine Depletion der mitochondrialen DNA bis zu einem Alter von zwei Jahren zeigt sich auch bei gesunden Kindern von HIV-infizierten Müttern unter AZT-Therapie (Poirier et al., 2003). Nicht nur bei Menschen, sondern auch bei Mäusen konnte eine negative Auswirkung von AZT auf die Mitochondrien festgestellt werden. Hier zeigten sich Schädigungen der mtDNA sowohl in der Leber als auch in der Plazenta von Mäusen. Dabei handelt es sich um ultrastrukturelle, biochemische und molekulare Schäden (Bialkowska et al., 2000). Auch die Anzahl der mtDNA ist in der Plazenta von HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie geringer als bei HIV-negativen Schwangeren (Gingelmaier et al., 2009; Shiramizu et al.; 2003).

In den bisherigen Studien zur mitochondrialen Mutagenese in der Plazenta wurden immer Proben von HIV-infizierten Schwangeren mit Proben von HIV-negativen Schwangeren verglichen. In dieser vorliegenden Arbeit befinden sich sowohl in der Behandlungs- als auch in der Kontrollgruppe HIV-infizierte Schwangere mit dem Unterschied, dass die Behandlungsgruppe eine AZT-Therapie erhalten hat und die Kontrollgruppe keinerlei antiretrovirale Medikamente bekommen hat.

Aufgrund der oben genannten Tatsachen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein Unterschied in der Plazenta zwischen HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und HIV-infizierten Schwangeren ohne Therapie hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese vorliegt. Dazu wurde die gesamte und die spezifisch deletierte mtDNA von je 61 Plazentaprobe aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe untersucht. Bei der absoluten Quantifizierung konnte nur in der

Behandlungsgruppe ein Deletionsanteil von 8,19 % an der gesamten mtDNA festgestellt werden, während sich in der Kontrollgruppe keine Deletion zeigte. Der Unterschied dieser beiden Gruppen stellte sich allerdings als nicht signifikant heraus. Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit, stellt sich die Frage, warum die untersuchten Proben der Behandlungsgruppe keinen erhöhten Anteil der 4977 bp Deletion aufweisen. Dafür gibt es zwei unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits ist es möglich, dass durch den insgesamt erhöhten Gehalt an mtDNA in der Behandlungsgruppe die geschädigte DNA durch eine erhöhte Produktion von mtDNA kompensiert wird und andererseits ist bekannt, dass die mitochondriale Mutagenese von mehreren verschiedenen Faktoren abhängt, wie Alkohol (Fromenty et al., 1995; von Wurmb-Schwark et al., 2008), Nikotin (Fahn et al., 1998) oder UV-Licht (Koch et al., 2001). Während diese Faktoren für ihre schädigende Wirkung bekannt sind, gibt es auch schützende Faktoren wie zum Beispiel grünen Tee (Iwai et al., 2006). Keiner dieser Einflussfaktoren konnte in dieser Arbeit berücksichtigt werden. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass weitere genetische Faktoren die mitochondriale Mutagenese beeinflussen könnten, wie im Blut von sehr alten Individuen gezeigt wurde, welche einen signifikant niedrigeren mtDNA-Gehalt haben (von Wurmb-Schwark et al., 2010). Folglich könnten die Ergebnisse auch durch externe und interne genetische Faktoren erklärt werden.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle untersucht. Hierbei zeigte sich eine Abweichung zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe. In der Behandlungsgruppe zeigt sich mit durchschnittlich 467 mtDNA-Kopien pro Zelle ein erhöhter Wert im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 216 mtDNA-Kopien pro Zelle. Dies widerspricht den bisherigen Beobachtungen in der Literatur. Sowohl Gingelmaier et al. 2009 als auch Shiramizu et al., 2003 zeigten eine geringere Anzahl von mtDNA-Kopien in Plazentaprobe von HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie gegenüber Kontrollpersonen. Allerdings handelte es sich in beiden Fällen um HIV-negative Schwangere in der Kontrollgruppe, während sich dagegen in dieser Arbeit HIV-infizierte Schwangere ohne antiretrovirale Therapie befinden. Das Ergebnis dieser Arbeit könnte darauf hinweisen, dass HIV selber zu mitochondrialen Schädigungen führt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchungen hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese zwischen HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie einen

Unterschied bezüglich der Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle, aber nicht bezüglich der Deletionskopien aufweist.

5.6. Gibt es einen Unterschied im Nabelschnurgewebe von HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und von HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese?

Im Nabelschnurgewebe zeigen sich in vielen Fällen unter AZT-Behandlung Veränderungen der Mitochondrien. Torres et al. 2008 zeigte, dass es zu Sequenzveränderungen, die meistens den Austausch einer Aminosäure betrifft, in der mtDNA im Nabelschnurgewebe von HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie gegenüber HIV-negativen Schwangeren kommt. Des Weiteren wurden morphologische Schädigungen der Mitochondrien in der Nabelschnur von HIV-infizierten Schwangeren festgestellt (Divi et al., 2004). Hierbei zeigten sich sowohl bei Menschen als auch bei Affen gleiche Unterschiede zwischen HIV-infizierten Schwangeren und HIV-negativen Schwangeren. Es konnte auch ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Depletion der mtDNA sowohl bei Menschen als auch bei Affen festgestellt werden (Divi et al., 2007). In der Nabelschnur HIV-infizierter Schwangeren mit AZT-Therapie zeigte sich des Weiteren eine geringere Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle gegenüber HIV-negativen Schwangeren (Shiramizu et al., 2003).

In den bisherigen Studien zur mitochondrialen Mutagenese des Nabelschnurgewebes wurden immer Proben von HIV-infizierten Schwangeren mit Proben von HIV-negativen Schwangeren verglichen. In dieser vorliegenden Arbeit befinden sich sowohl in der Behandlungs- als auch in der Kontrollgruppe HIV-infizierte Schwangere mit dem Unterschied, dass die Behandlungsgruppe eine AZT-Therapie erhalten hat und die Kontrollgruppe keinerlei antiretrovirale Medikamente bekommen hat.

Aufgrund der oben genannten Tatsachen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein Unterschied im Nabelschnurgewebe zwischen HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und HIV-infizierten Schwangeren ohne Therapie hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese besteht. Dazu wurde die gesamte und die spezifisch deletierte mtDNA von je 61 Nabelschnurproben aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe untersucht. Bei der absoluten Quantifizierung konnte nur in der

Kontrollgruppe ein Deletionsanteil von insgesamt 8,19% an der gesamten DNA detektiert werden, während in der Behandlungsgruppe keine einzige Deletion gefunden wurde. Allerdings stellt sich der Unterschied der beiden Gruppen als nicht signifikant heraus.

Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit, stellt sich die Frage, warum die untersuchten Proben der Behandlungsgruppe keinen erhöhten Anteil der 4977 bp Deletion aufweisen, beziehungsweise warum nur Deletionen in der Kontrollgruppe gefunden wurden, die keine AZT-Therapie erhalten haben. Dafür gibt es wie beim Plazentagewebe zwei unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits kann durch den insgesamt erhöhten Gehalt an mtDNA in der Behandlungsgruppe die geschädigte DNA durch eine erhöhte Produktion von mtDNA kompensiert wird und andererseits gibt es verschiedene Faktoren von denen die mitochondriale Mutagenese abhängt, wie Alkohol (Fromenty et al., 1995; von Wurmb-Schwark et al., 2008), Nikotin (Fahn et al., 1998) oder UV-Licht (Koch et al., 2001). Während diese Faktoren für ihre schädigende Wirkung bekannt sind, gibt es auch schützende Faktoren wie zum Beispiel grünen Tee (Iwai et al., 2006). Keiner dieser Einflussfaktoren wurde in dieser Arbeit berücksichtigt. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass weitere genetische Faktoren die mitochondriale Mutagenese beeinflussen könnten, wie im Blut von sehr alten Individuen gezeigt wurde, welche einen signifikant niedrigeren mtDNA-Gehalt haben (von Wurmb-Schwark et al., 2010). Folglich könnten die Ergebnisse auch durch externe und interne genetische Faktoren erklärt werden.

Zusätzlich zur 4977 bp Deletion wurde in dieser Arbeit auch die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle untersucht. In der Behandlungsgruppe waren durchschnittlich 270 mtDNA-Kopien pro Zelle vorhanden und in der Kontrollgruppe durchschnittlich 177 Kopien. Dieser Unterschied stellte sich als signifikant heraus. In der Literatur zeigte sich bisher eine niedrigere Anzahl der mtDNA-Kopien unter AZT-Therapie gegenüber Kontrollen (Shiramizu et al., 2003). Allerdings befanden sich in der Kontrollgruppe HIV-negative Schwangere, wohingegen in dieser Arbeit auch in der Kontrollgruppe HIV-infizierte Schwangere sind, die keine antiretrovirale Therapie erhalten haben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Untersuchungen hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese zwischen HIV-infizierten Schwangeren mit AZT-Therapie und HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie einen

Unterschied bezüglich der Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle, aber nicht bezüglich der Deletionskopien aufweisen.

5.7. Gibt es einen Unterschied zwischen Plazenta- und Nabelschnurgewebe hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese?

In dieser Arbeit wurde untersucht ob ein Unterschied hinsichtlich der mitochondrialen Genese zwischen Plazenta- und Nabelschnurgewebe sowohl insgesamt als auch innerhalb der Behandlungs- und Kontrollgruppe besteht. Hierzu wurden je 122 Plazenta- und Nabelschnurproben auf die gesamte und die spezifisch deletierte mtDNA hin untersucht.

Insgesamt konnte sowohl bezüglich der mtDNA-Kopien pro Zelle als auch der 4977 bp Deletion kein Unterschied zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe festgestellt werden.

Innerhalb der Behandlungsgruppe konnte bei der absoluten Quantifizierung eine Deletionsanteil von insgesamt 8,19 % an der gesamten mtDNA im Plazentagewebe detektiert werden, während im Nabelschnurgewebe keine Deletion vorhanden war. Dieser Unterschied stellt sich als nicht signifikant heraus. Hinsichtlich der Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle in der Behandlungsgruppe konnte im Plazentagewebe mit durchschnittlich 467 Kopien ein höherer Wert als im Nabelschnurgewebe mit durchschnittlich 270 mtDNA-Kopien pro Zelle erreicht werden. Allerdings zeigte sich auch dieser Unterschied als nicht signifikant. Dies weist daraufhin, dass sich die AZT-Therapie bei HIV-infizierten Schwangeren hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese gleichmäßig auf Nabelschnur und Plazenta auswirkt.

In der Kontrollgruppe zeigte sich bei der absoluten Quantifizierung ein Deletionsanteil von insgesamt 8,19 % an der gesamten mtDNA in der Nabelschnur, während in der Plazenta keine Deletion detektiert werden konnte. Hierbei handelt es sich aber um keinen signifikanten Unterschied. Bezüglich der Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle konnte in der Nabelschnur mit durchschnittlich 177 Kopien ein etwas niedrigerer Wert gegenüber der Plazenta mit durchschnittlich 216 mtDNA-Kopien pro Zelle festgestellt werden. Dieser Unterschied stellte sich ebenfalls als nicht signifikant heraus. Dies weist daraufhin, dass bei HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie kein Unterschied hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe besteht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchungen hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese zwischen Nabelschnur- und Plazentagewebe sowohl innerhalb der Behandlungs-, als auch der Kontrollgruppe keinen Unterschied aufweisen.

5.8. Auswirkung von AZT und HIV auf die mitochondriale DNA-Mutagenese

Es gibt mehrere Studien an Tieren und Menschen die belegen, dass sowohl AZT als auch HIV mitochondriale Toxizität verursachen und die Menge an mtDNA reduzieren (Chen et al., 1991; Dalakas et al., 1990; Gerschenson et al., 2000; Divi et al., 2007; Divi et al., 2010; Aldrovandi et al., 2009; Miro et al., 2004).

In dieser Studie zeigte sich ein erhöhter Anteil an mtDNA-Kopien bei den Patientinnen unter AZT-Therapie. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen von Aldrovandi et al. 2009 überein, der Proben von HIV-positiven Müttern mit gleicher Krankheitsprogression, aber unterschiedlicher pränataler Anwendung von NRTIs untersucht hat, und einen höheren mtDNA-Gehalt bei AZT-exponierten Patientinnen gefunden hat, welcher auch noch fünf Jahre später bestand. Eine andere Studie mit widersprechenden Ergebnissen, die einen geringeren mtDNA-Gehalt bei Kindern unter AZT-Therapie gezeigt hat (Poirier et al., 2003), ist nur zum Teil vergleichbar, da die Krankheitsprogression der Kinder sehr unterschiedlich war.

In dieser Arbeit wurde Plazenta- und Nabelschnurgewebe untersucht, welches mitochondriale Schädigungen, die durch AZT verursacht werden widerzuspiegeln scheint. Bei Affen unter pränataler AZT-Therapie zeigte sich ein geringerer mtDNA-Gehalt in Plazenta- und Nabelschnurgewebe, welcher mit einer erhöhten morphologischen Veränderung der Mitochondrien korreliert (Gerschenson et al., 2000; Divi et al., 2007). Dies weist daraufhin, dass der mtDNA-Gehalt in Plazenta- und Nabelschnurgewebe ein geeigneter Marker zur Bestimmung der mitochondrialen Toxizität unter AZT-Therapie ist.

Insgesamt wurde kein Hinweis gefunden, dass HIV in Kombination mit AZT das Risiko für die 4977 bp Deletion in Plazenta- oder Nabelschnurgewebe erhöht.

Es besteht kein Zweifel, dass AZT mitochondriale Schäden verursachen kann, aber man muss die schädigende Wirkung den positiven Effekten einer AZT-Therapie gegenüberstellen. Bei HIV-infizierten Personen zeigt sich eine erhöhte Menge des Tumornekrosefaktors alpha (TNF-alpha) (Olivetta et al., 2003; Buonaguro et al.,

1992) welche zu mitochondrialen Schäden wie Depletionen führen kann (Suematsu et al., 2003; Suliman et al., 2005). Interessanterweise hat sich gezeigt, dass AZT zu einer Herunterregulierung des TNF-alpha im Plazentagewebe führt (Pornprasert et al., 2006). Dieser Mechanismus könnte HIV-induzierten Schäden vorbeugen und die erhöhte Menge an mtDNA-Kopien in Plazenta- und Nabelschnurgewebe bei HIV-infizierten Müttern unter AZT-Therapie erklären.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die mitochondriale Mutagenese im Nabelschnur- und Plazentagewebe von HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie gegenüber HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie untersucht. Dazu wurde einerseits die spezifische 4977 bp Deletion und andererseits die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle sowohl im Nabelschnur-, als auch im Plazentagewebe von je 61 Schwangeren aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe quantifiziert.

Das zu untersuchende Material lag bei -20 °Celsius in sogenannten Cryovials eingefroren vor. Vom Plazentagewebe wurden je 12,5 mg pro Probe und vom Nabelschnurgewebe je 25 mg pro Probe in die DNA-Extraktion mittels Invisorb® Spin Tissue Mini Kit eingesetzt. Anschließend wurde die Menge der nukleären DNA pro µl mit Hilfe des ABI 7300 quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung zeigten einen Unterschied in Bezug auf den nDNA-Gehalt zwischen Nabelschnur und Plazenta. Es konnte eine signifikant höhere Menge an nDNA im Plazenta- gegenüber dem Nabelschnurgewebe festgestellt werden. Innerhalb der einzelnen Gewebe konnte allerdings kein Unterschied zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

Des Weiteren wurde der Anteil der 4977 bp Deletion an der gesamten DNA in den Proben bestimmt, um etwas über die mitochondriale Mutagenese in der Nabelschnur und Plazenta von HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie und HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie aussagen zu können. Es wurde einerseits die spezifische deletierte und andererseits die gesamte mtDNA (Wildtyp) in den Proben quantifiziert um den Anteil der 4977 bp Deletion zu ermitteln. Die Quantifizierung dieser beiden Komponenten erfolgte absolut am ABI 7300 und für einen kleinen Teil der Proben zusätzlich relativ am ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer. In beiden Fällen wurde die Quantifizierung in Form einer Duplex-PCR durchgeführt, in der zwei spezifische Fragmente gleichzeitig amplifiziert werden können. Von den insgesamt 244 untersuchten Proben konnte bei der absoluten Quantifizierung in fünf Fällen (8,19 %) der Nabelschnur in der Kontrollgruppe und in fünf Fällen (8,19 %) der Plazenta in der Behandlungsgruppe die 4977 bp Deletion nachgewiesen werden. Für die ausgewählten Proben wurden die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung durch die relative Quantifizierung bestätigt. Sowohl

innerhalb des Nabelschnur- als auch des Plazentagewebes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch zwischen Nabelschnur und Plazenta besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Deletionsanteils.

Zusätzlich zur 4977 bp Deletion wurde auch die Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle bestimmt. Hierbei zeigte sich sowohl in der Nabelschnur als auch in der Plazenta ein signifikanter Unterschied zwischen den HIV-infizierten Schwangeren unter AZT-Therapie und den HIV-infizierten Schwangeren ohne antiretrovirale Therapie. Zwischen dem Nabelschnur- und Plazentagewebe zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied.

Insgesamt zeigte sich hinsichtlich der mitochondrialen Mutagenese ein signifikanter Unterschied bezüglich der Kopienanzahl der mtDNA zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe sowohl im Nabelschnur- als auch im Plazentagewebe. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geweben konnte allerdings nicht festgestellt werden.

7. ANHANG

7.1. Geräte und Reagenzien nach Art der Anwendung

DNA-Extraktion:

- Centrifuge 5451C, EPPENDORF
- Ethanol, J.T. BAKER
- Spin Tissue Mini-Kit, INVITEK
- Reaktionsgefäße 1,5ml, EPPENDORF
- Skalpell, FEATHER
- Thermomixer 5434, EPPENDORF
- Vortex Genie 2, BENDER und HOBEIN AG
- Pipette 10-100µl, EPPENDORF
- Pipette 100-1000µl, EPPENDORF
- Pipettenspitze 200µl, SARSTEDT
- Pipettenspitze 1000µl, SARSTEDT

Gelelektrophorese:

- Elektrophoresekammer HU-10, ROTH
- Ethidium Bromid Solution, INVITROGEN
- Gel-Doc UV-Kammer, BIORAD
- Hyperladder I, BIOLINE
- LE-Agarose, BIOZYM
- Loading Buffer *
- TBE-Puffer 5x: 270g Tris, 137,5g Borsäure, 100ml 0,5M EDTA, ph 8

Agarosegellösung:

1g Agarose auf 100ml 1x TBE geben, aufkochen und kurz abkühlen lassen. Dann 5µl Ethidiumbromidlösung dazugeben und alles in die Gelkammer gießen. Anschließend die Kämme einsetzen und bei Raumtemperatur 30min auspolymerisieren lassen.

* Loading Buffer 10x:

Für 100ml: 250mg Bromphenolblau, 250mg Xylene Cyanol und 25g Ficoll 400 in 80ml H₂O lösen und auf 100ml auffüllen. (Endkonzentration: in 100ml sind 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene Cyanol und 25% Ficoll 400 enthalten.

Realtime-PCR:

- ABI 7300 Real Time PCR System, APPLIED BIOSYSTEM
- Folie: Optical Adhesive Cover Starter Kit, APPLIED BIOSYSTEM
- Thermo-FastÒ 96 Detection Plate, ABGENE
- PCR-Soft strips 0,2 ml, farblos, BIOZYM
- Pipette 0,1-2,5 µl, EPPENDORF
- Pipette 10-100 µl, EPPENDORF
- Pipette 2-20 µl, EPPENDORF
- Pipette 100-1000 µl, EPPENDORF
- Primer wt F/R, BIOMERS
- Primer del F/R, BIOMERS
- Primer telo F/R; BIOMERS
- Quantifiler® Human DNA Quantifications Kit
- SafeSeal-TipsÒ Professional 2,5 µl, BIOZYM
- SafeSeal-TipsÒ Professional 10 µl, BIOZYM
- SafeSeal-TipsÒ Professional 100 µl, BIOZYM
- SafeSeal-TipsÒ Professional 600 µl, BIOZYM
- Sequence Detection Software Version 1.3.1, APPLIED BIOSYSTEM
- Sonde wt, FAM markiert, BIOMERS
- Sonde del, VIC markiert, BIOMERS
- Sonde telo, NED markiert, BIOMERS

Duplex-PCR:

- ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, APPLIED BIOSYSTEM
- Dimethylsulfoxyde (DMSO), BIOGENE
- DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M, KISKER
- dNTPs, BIOGENE
- Formamid Hi-D, APPLIED BIOSYSTEM
- Gene Amp PCR-System 2400, APPLIED BIOSYSTEM

- Gene Amp PCR-System 2700, APPLIED BIOSYSTEM
- Gene Amp PCR-System 9700, APPLIED BIOSYSTEM
- GeneScan Analysis Software, Version 3.1.2, APPLIED BIOSYSTEM
- GeneScan 500 ROX, APPLIED BIOSYSTEM
- HPLC-Wasser, J.T. BAKER
- Immobuffer 10x, BIOGENE

Standardherstellung:

- Dimethylsulfoxyde (DMSO), BIOGENE
- DNA aus Skelettmuskel
- DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M, KISKER
- dNTPs, BIOGENE
- Elektrophoresekammer HU-10, ROTH
- Ethidium Bromid Solution, INVITROGEN
- Gel-Doc UV-Kammer, BIORAD
- HPLC-Wasser, J.T. BAKER
- Hyperladder IV, BIOLINE
- Immobuffer 10x, BIOGENE
- Immolase™ DNA Polymerase, BIOGENE
- MgCl₂, 50 mM, BIOLINE
- LE-Agarose, BIOZYM
- Loading Buffer * (siehe Gelelektrophorese)
- Maus-DNA
- Pipette 0,1-2,5 µl, EPPENDORF
- Pipette 10-100 µl, EPPENDORF
- Pipette 2-20 µl, EPPENDORF
- Pipette 100-1000 µl, EPPENDORF
- Pipettenspitze 2,5 µl, SARSTEDT
- Pipettenspitze 10 µl, SARSTEDT
- Pipettenspitze 200 µl, SARSTEDT
- Pipettenspitze 1000 µl, SARSTEDT
- Primer wt L15/H16 (F/R), unmarkiert; BIOMERS
- Primer del L35/H45 (F/R), unmarkiert, BIOMERS
- Reaktionsgefäße 1,5 ml, EPPENDORF

- Reaktionsgefäße 0,2 µl, EPPENDORF
- TBE-Puffer 5x: 270 g Tris, 137,5 g Borsäure, 100 ml 0,5 M EDTA , pH 8
- TE-Puffer (Tris-EDTA)1x : 10 mM Tris, 0,2mM EDTA, pH 7,5
- Zelllinie: Human Genomic Female G152A, PROMEGA

Powerplex-PCR:

- ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer, APPLIED BIOSYSTEM
- Gene Amp PCR System 9700, APPLIED BIOSYSTEMS
- Gene Amp PCR System 2700, APPLIED BIOSYSTEMS
- DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M, KISKER
- Vortexer, SCIENTIFIC INDUSTRIES
- Gene Amp PCR-System 2700, APPLIED BIOSYSTEM
- Gene Amp PCR-System 9700, APPLIED BIOSYSTEM
- Micro Amp Optical 96 wellreaction plates, APPLIED BIOSYSTEMS
- Optical Adhesive Covers, APPLIED BIOSYSTEMS
- Reaktionsgefäße 0,2 µl, EPPENDORF
- Reaktionsgefäße 0,5 µl, EPPENDORF
- Reaktionsgefäße 1,5 ml, EPPENDORF
- Pipette 0,1-2,5 µl, EPPENDORF
- Pipette 10-100 µl, EPPENDORF
- Pipette 2-20 µl, EPPENDORF
- Pipette 100-1000 µl, EPPENDORF
- Pipettenspitze 2,5 µl, SARSTEDT
- Pipettenspitze 10 µl, SARSTEDT
- Pipettenspitze 200 µl, SARSTEDT
- Pipettenspitze 1000 µl, SARSTEDT
- Powerplex 16 HS 5x Master Mix, 250µl, PROMEGA
- Powerplex 16 HS 10x Primer Pair Mix, 250 µl, PROMEGA
- steriles Wasser, 1250µl, PROMEGA
- 9947A DNA, 10ng/µl, 25µl, PROMEGA

Primerpaare und Sonden:

Tabelle 1: Primerpaare und Sonden

Primer	Sequenz (5'-3')	Göße	Anwendung
L 15*	FAM -AAC-ATA-CCC-ATG-GCC-AAC-CTC-CTA-C	260bp	Duplex
H 16*	CAT-AGT-AGA-AGA-GCG-ATG-GTG-AGA-G	260bp	Duplex
L 35*	FAM -CTC-TAG-AGC-CCG-CTG-TAA-AGC-TAA-C'	238bp	Duplex
H 45*	CCT-GTG-AGG-AAA-GGT-ATT-CCT-GCT-A	238bp	Duplex
wt F*	CCC-TTC-GCT-GAC-CCC-ATA	113bp	Duplex / Realtime
wt R*	AGT-AGA-AGA-GCG-ATG-GTG-AGA-GC	113bp	Duplex / Realtime
Sonde wt*	FAM -TTC-ACC-AAA-GAG-CCC-CTA-A-MGB	-----	Duplex / Realtime
del F*	CAC-CAT-AAT-TAC-CCC-CAT-ACT-CCT-TA	122bp	Duplex / Realtime
del R*	GAG-GAA-AGG-TAT-TCC-TGC-TAA-TGC	122bp	Duplex / Realtime
Sonde del	VIC -ACC-ACC-TAC-CTC-CCT-CAC-MGB	-----	Duplex / Realtime
telo F*	GGC-ACA-CGT-GGC-TTT-TCG	98bp	Realtime
telo R*	GGT-GAA-CCT-CGT-AAG-TTT-ATG-CAA	98bp	Realtime
Sonde Telo*	NED -ACG-TCG-AGT-GGA-CAC-G-MGB	-----	Realtime

* synthetisiert von der Firma BIOMERS

7.2. PCR-Ansätze und Profile

7.2.1. Realtime-PCR

7.2.1.1. nukleäre Realtime-PCR

Tabelle 2: Ansatz der Realtime-PCR / nukleäre DNA (einfacher Mastermix)

Mastermix	μl	Endkonzentration
Bidest	13,93	
Immobuffer	2,50	10x
dNTPs	2,00	je 2,5 mM
Primermix telo (F/R)	2,00	je 4 pmol
DMSO	1,00	100%
MgCl ₂	0,75	50 mM
Sonde telo	0,625	2,5 pmol
Immolase	0,20	5 U/ μl
Mastermix	23,00	
Probe	2,00	

Tabelle 3: Temperaturprofil der nukleären Realtime-PCR, 40 Zyklen

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Erhitzen	50°C	10 sek.	
Denaturierung	95°C	10 min.	
Denaturierung	95°C	30 sek.	40
Annealing + Elongation	60°C	1 min.	40

7.2.1.2. mtDNA Realtime-PCR

Tabelle 4: Ansatz der Realtime-PCR / mtDNA (einfacher Mastermix)

Mastermix	μl	Endkonzentration
Bidest	12,80	
Immobuffer	2,50	10x
dNTPs	2,00	je 2,5 mM
Primermix wt (F/R)	0,50	je 4 pmol
Primermix del (F/R)	2,00	je 4 pmol
DMSO	1,00	100%
MgCl ₂	0,75	50 mM
Sonde wt	0,625	2,5 pmol
Sonde del	0,625	2,5 pmol
Immolase	0,20	5 U/ μl
Mastermix	23,00	
Probe	2,00	

Tabelle 5: Temperaturprofil der Realtime-PCR / mtDNA , 40 Zyklen

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Erhitzen	95°C	10 min.	
Denaturierung	94°C	1 min.	40
Denaturierung	55°C	1 min.	40
Annealing + Elongation	72°C	2 min.	40

7.2.2 Duplex-PCR

Tabelle 6: Ansatz der Duplex-PCR / spezifisch deletierte und Wildtyp-DNA (einfacher Mastermix)

Mastermix	µl	Endkonzentration
Bidest	6,90	
Immobuffer	1,25	10x
dNTPs	1,00	je 2,5 mM
Primermix L35/H45 (F/R) (1/10 verdünnt)	0,25	je 0,1 pmol
Primermix L15/H16 (F/R)	0,13	je 1 pmol
DMSO	0,50	100%
MgCl ₂	0,38	50 mM
Immolase	0,10	5 U/µl
Mastermix	10,50	
Probe	2,00	

Tabelle 7: Temperatur der Duplex-PCR, 35 Zyklen

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Erhitzen	95°C	5 min.	
Denaturierung	94°C	1 min.	35
Annealing	55°C	1 min.	35
Elongation	72°C	2 min.	35
Hold	15°C	∞	

7.2.3. Powerplex-PCR

Tabelle 8: Ansatz der Powerplex-PCR (einfacher Mastermix)

Mastermix	μl
Puffer-Mix	1,25
Primer-Mix	0,625
Aqua bidest	3,375
Mastermix	5,25
Probe	1,00

Tabelle 9: Temperaturprofil der Powerplex

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Erhitzen	96°C	2 min.	
Denaturierung	94°C	30 sek.	10
Annealing	60°C	30 sek.	10
Elongation	70°C	45 sek.	10
Denaturierung	90°C	30 sek.	22
Annealing	60°C	30 sek.	22
Elongation	70°C	45 sek.	22
Hold	60°C	30 min.	

7.3. Ergebnisse

Tabelle 10: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung der nukleären DNA (Behandlungs- und Kontrollgruppe). Angegeben sind die nDNA-Mengen pro μl die mittels Realtime-PCR am ABI 7300 ermittelt wurden.

Behandlungs- gruppe	nukleäre DNA-Menge pro μl (ng/ μl)		Kontroll- gruppe	nukleäre DNA-Menge pro μl (ng/ μl)	
	Proben- nummer	Plazenta		Nabel- schnur	Proben- nummer
2	200,50	44,86	503	201,50	4,03
3	94	19,71	505	293	16,59
7	349	11,36	507	82,50	19,99
12	37,60	1,69	508	189,50	5,05
21	1765	55,89	509	156,50	4,89
22	152,50	27,02	510	82,50	5,37
24	57,50	4,74	511	140,50	152
30	146	24,88	512	205	37,20
32	785	15,90	514	44,20	24,95
33	108	8,31	515	730	11,66
34	2195	12,39	516	249	26,71
35	209	37,45	517	57	28,09
37	204	76	518	302,50	67,73
38	4660	91,50	519	1470	9,84
40	643,50	28,38	520	341,50	34,46
49	247,50	36,06	522	268	24,21
57	550	7,53	523	830	140,58
60	213,50	5,18	524	529	8,98
63	126,50	9,52	525	620	4,09
66	89,23	15,90	526	40,75	22,04
68	830	25,08	527	39,35	15,77
75	112,50	7,76	528	73,50	38,88
79	65,08	3,72	530	371,50	21,81
80	40,47	5,24	531	545	139,50
81	130	77	532	119,50	4,15
86	1560	99,50	534,1	575,50	6,81
91	69,30	4,31	534,2	152	2,37
95	120	7,70	535	940	33,54
96	41,84	18,12	539	620	22,45
97	856,50	12,88	540	320	55
98	3870	44,65	541	180,07	5,81
107	144,36	12,42	543	264,50	4,13
108	5,06	1,61	547	66,50	5,95
111	117,50	6,59	548	381	10,63
119	132,30	3,81	549	23,41	17,86
120	338	2,88	550	13,30	77,05

121	565	4,02	552	510	7,87
122	40,70	71,89	553	200,62	93,50
123	173	33,30	554	133,50	14,59
129	101	10	555	790	6,78
130	983,5	38,75	556	212,50	16,30
132	545	5,33	557	164	92,50
133	575	5,36	558	306	29,75
135	97,5	2,86	559	3655	34,75
137	15,20	2,65	560	179	25,71
138	880	47,15	563	346	11,75
139	610	39,50	564	97,50	47,66
146	68,59	8,45	565	146	5,52
149	62,80	1,85	566	765	2,86
150	13,12	9,21	567	44,95	16,30
153	88,53	6,83	568	895	27,73
155	0	64,07	569	1850	13,45
163	101,80	4,78	570	207,12	18,85
181	3605	24,59	574	377,50	8,26
182	87,96	1,69	576	2100	24,12
186	244,23	81	579	206,52	17,45
187	129,67	54,77	581	32,01	140,57
188	55,98	52,84	582	404,80	5,94
189	128,23	153,99	583	43,49	2,09
191	9,75	83,09	584	57,75	17,91
193	253,61	6,00	585	110,99	11,16

Tabelle 11: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung der nukleären DNA (Behandlungs- und Kontrollgruppe). Angegeben ist die Zellzahl pro μl die mittels Realtime-PCR am ABI 7300 ermittelt wurden.

Behandlungs- gruppe	Zellzahl pro μl		Kontroll- gruppe	Zellzahl pro μl	
	Proben- nummer	Plazenta		Nabel- schnur	Proben- nummer
2	30.379	6.797	503	30.530	611
3	14.242	2.986	505	44.394	2.513
7	52.879	1.721	507	12.500	3.029
12	5.697	256	508	28.712	765
21	167.424	8.467	509	23.712	741
22	23.106	4.094	510	12.500	813
24	8.712	717	511	21.288	23.030
30	22.121	3.769	512	31.061	5.636
32	118.939	2.408	514	6.697	3.780
33	16.364	1.258	515	110.606	1.767

34	332.576	1.877	516	37.727	4.047
35	31.667	5.674	517	8.636	4.255
37	30.909	11.515	518	45.833	10.261
38	70.606	13.864	519	159.848	1.491
40	97.500	4.299	520	51.742	5.220
49	37.500	5.463	522	40.606	3.667
57	83.333	1.140	523	125.758	21.299
60	32.348	784	524	80.152	1.360
63	19.167	1.442	525	93.939	619
66	13.520	2.408	526	6.174	3.339
68	125.758	3.800	527	5.962	2.389
75	17.045	1.176	528	11.136	5.891
79	9.861	564	530	56.288	3.305
80	6.132	793	531	82.576	21.136
81	19.697	11.667	532	18.106	629
86	236.364	15.076	534,1	87.197	1.031
91	10.499	653	534,2	23.030	359
95	18.182	1.166	535	142.424	5.081
96	6.339	2.745	539	93.939	3.401
97	129.773	1.951	540	48.485	8.333
98	586.364	6.765	541	27.283	880
107	21.872	1.882	543	40.076	626
108	766	243	547	10.076	901
111	17.803	998	548	1.174.621	1.610
119	20.045	577	549	3.547	2.706
120	51.212	436	550	2.014	11.673
121	85.606	609	552	3.367.500	1.192
122	6.167	10.892	553	30.396	14.167
123	26.212	5.045	554	623.106	2.211
129	15.303	1.515	555	2.839.470	1.027
130	149.015	5.871	556	800.303	2.470
132	82.576	808	557	520.909	14.015
133	87.121	811	558	1.817.879	4.508
135	14.773	433	559	1.199.242	5.264
137	2302	402	560	594.924	3.895
138	133.333	7.144	563	462.652	1.780
139	92.424	5.985	564	398.106	7.221
146	10.392	1.280	565	819.621	836
149	9.514	280	566	115.909	433
150	1.988	1.395	567	250.152	2.470
153	13.413	1.034	568	135.606	4.201
155	0	9.708	569	280.303	2.038
163	15.424	724	570	31.382	2.856
181	546.212	3.726	574	57.197	1.252
182	13.327	256	576	318.182	3.655
186	37.005	12.273	579	31.291	2.644
187	19.647	8.298	581	4.850	21.298
188	8.482	8.006	582	61.333	900

189	19.429	23.332	583	6.589	317
191	1.477	12.589	584	8.750	2.714
193	23.274	909	585	16.817	1.691

Tabelle 12: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung der mitochondrialen DNA (Behandlungs- und Kontrollgruppe). Angegeben ist die Anzahl der wt-Kopien pro Zelle die mittels Realtime-PCR am ABI 7300 ermittelt wurden.

Behandlungs- gruppe	Anzahl der wt-Kopien pro Zelle		Kontroll- gruppe	Anzahl der wt-Kopien pro Zelle	
	Plazenta	Nabel- schnur		Plazenta	Nabel- schnur
Proben- nummer	Plazenta	Nabel- schnur	Proben- nummer	Plazenta	Nabel- schnur
2	483	66	503	213	121
3	321	196	505	107	0
7	843	378	507	413	198
12	9.257	536	508	255	127
21	111	89	509	245	94
22	240	289	510	640	39
24	807	1.254	511	566	47
30	139	342	512	145	24
32	95	165	514	210	0
33	291	9	515	93	0
34	65	262	516	478	0
35	162	49	517	429	186
37	391	515	518	971	29
38	286	22	519	213	71
40	397	39	520	22	178
49	185	109	522	334	39
57	1	131	523	115	75
60	52	242	524	186	265
63	475	590	525	1	283
66	267	134	526	895	454
68	156	41	527	887	502
75	1.098	22	528	725	136
79	832	454	530	107	75
80	1.076	110	531	49	33
81	484	148	532	310	198
86	123	46	534,1	4	249
91	505	19	534,2	196	97
95	430	109	535	150	149
96	812	139	539	85	75
97	1	63	540	114	155
98	103	46	541	33	105
107	331	138	543	359	414
108	473	250	547	1.168	611

111	313	145	548	1	86
119	277	945	549	488	201
120	8	323	550	57	81
121	134	241	552	0	638
122	0	73	553	266	1
123	115	372	554	2	396
129	310	54	555	2	273
130	148	564	556	4	0
132	361	381	557	1	34
133	9	231	558	33	35
135	145	187	559	38	314
137	1.540	1.052	560	30	70
138	13	78	563	34	234
139	302	791	564	71	624
146	156	209	565	2	0
149	241	800	566	125	310
150	347	79	567	103	177
153	324	143	568	157	118
155	0	259	569	100	348
163	188	33	570	139	137
181	34	340	574	33	74
182	209	584	576	110	45
186	10	190	579	225	84
187	162	173	581	101	188
188	249	305	582	143	264
189	175	195	583	185	134
191	144	181	584	165	496
193	309	633	585	281	384

Tabelle 13: Ergebnisse der absoluten Quantifizierung der mitochondrialen DNA (Behandlungs- und Kontrollgruppe). Angegeben ist die Anzahl der Deletionskopien pro μ l die mittels Realtime-PCR am ABI 7300 ermittelt wurden.

Behandlungs- gruppe	Anzahl der Deletions- kopien pro ml		Kontroll- gruppe	Anzahl der Deletions- kopien pro ml	
	Plazenta	Nabel- schnur		Plazenta	Nabel- schnur
2	0	0	503	0	0
3	0	0	505	0	0
7	0	0	507	0	0
12	0	0	508	0	0
21	0	0	509	0	0
22	0	0	510	0	0
24	0	0	511	0	0
30	0	0	512	0	0

32	0	0	514	0	0
33	0	0	515	0	0
34	0	0	516	0	0
35	0	0	517	0	0
37	0	0	518	0	0
38	0	0	519	0	0
40	0	0	520	0	0
49	0	0	522	0	0
57	0	0	523	0	0
60	0	0	524	0	0
63	0	0	525	0	0
66	0	0	526	0	0
68	0	0	527	0	0
75	0	0	528	0	0
79	0	0	530	0	0
80	1	0	531	0	0
81	0	0	532	0	0
86	0	0	534,1	0	0
91	1	0	534,2	0	0
95	0	0	535	0	20
96	2	0	539	0	0
97	2	0	540	0	0
98	0	0	541	0	0
107	0	0	543	0	0
108	0	0	547	0	0
111	0	0	548	0	0
119	2	0	549	0	0
120	0	0	550	0	0
121	0	0	552	0	0
122	0	0	553	0	0
123	0	0	554	0	0
129	0	0	555	0	0
130	0	0	556	0	0
132	0	0	557	0	0
133	0	0	558	0	0
135	0	0	559	0	0
137	0	0	560	0	3
138	0	0	563	0	59
139	0	0	564	0	224
146	0	0	565	0	0
149	0	0	566	0	0
150	0	0	567	0	0
153	0	0	568	0	0
155	0	0	569	0	0
163	0	0	570	0	0
181	0	0	574	0	0
182	0	0	576	0	0
186	0	0	579	0	15

187	0	0	581	0	0
188	0	0	582	0	0
189	0	0	583	0	0
191	0	0	584	0	0
193	0	0	585	0	0

Tabelle 14: Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Wildtyp-mtDNA. Angeben sind die Flächen der Peaks der wt-Kopien, die mittels relativer Quantifizierung am ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer ermittelt wurden. N = Nabelschnurgewebe, P = Plazentagewebe.

Probennummer	Duplex-PCR Fläche der Peaks
38N	63.686
86N	79.633
122N	79.167
523N	85.676
531N	56.234
553N	58.788
37P	76.641
57P	62.183
107P	59.582
119P	64.638
515P	76.764
525P	58.461
530P	67.954
541P	68.648

Tabelle 15: Berechnung der statistischen Relevanz mit dem „Mann-Whitney-U“-Verfahren.

Ergebnisse	Gruppe 1	Gruppe 2	Mann-Whitney-U-Ergebniss
absolute Quantifizierung mittels Singleplex-Realtime-PCR nDNA in ng/µl	Nabelschnur B + K	Plazenta B + K	$p = 2,83 \times 10^{-6}$
	Nabelschnur B	Nabelschnur K	$p = 0,48$
	Plazenta B	Plazenta K	$p = 0,63$
absolute Quantifizierung mittels Duplex-Realtime-PCR wt-Kopien/µl	Nabelschnur B + K	Plazenta B + K	$p = 3,55 \times 10^{-27}$
	Nabelschnur B	Nabelschnur K	$p = 0,51$
	Plazenta B	Plazenta K	$p = 0,90$

Zellzahl pro μl	Nabelschnur B + K	Plazenta B + K	$p = 4,91 \times 10^{-31}$
	Nabelschnur B	Nabelschnur K	$p = 0,53$
	Plazenta B	Plazenta K	$p = 3,99 \times 10^{-3}$
mtDNA-Kopien pro Zelle	Nabelschnur B + K	Plazenta B + K	$p = 0,81$
	Nabelschnur B	Nabelschnur K	$p = 0,039$
	Plazenta B	Plazenta K	$p = 8,91 \times 10^{-3}$
Zellzahl pro μl	Nabelschnur B	Plazenta B	$p = 7,52 \times 10^{-15}$
	Nabelschnur K	Plazenta K	$p = 3,09 \times 10^{-18}$
mtDNA-Kopien pro Zelle	Nabelschnur B	Plazenta B	$p = 0,31$
	Nabelschnur K	Plazenta K	$p = 0,84$
Deletionskopien pro μl	Nabelschnur B	Nabelschnur K	$p = 0,43$
	Plazenta B	Plazenta K	$p = 0,43$
	Nabelschnur B	Plazenta B	$p = 0,43$
	Nabelschnur K	Plazenta K	$p = 0,43$

7.4. Abkürzungen

A = Adenin

Abb. = Abbildung

ATP = Adenosin Triphosphat

B = Behandlungsgruppe

Bp = Basenpaare

bzw. = beziehungsweise

C = Cytosin

Ct = cycle threshold

Da = Dalton

D-Loop = Displacement Loop

Del = Deletion

DMSO = Dimethylsulfoxid
DNA = Desoxyribonukleinsäure
dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid
et al. = et alteri
F = Forward
g = Gramm
G = Guanin
h = Stunde
HL = Hyperladder
H-Strang = heavy strand
HV 1 = hypervariable Region 1
HV 2 = hypervariable Region 2
K = Kontrollgruppe
Kb = Kilobase
L-Strang = light strand
M = Molar
mg = Milligramm
MgCl₂ = Magnesiumchlorid
Min. = Minute
ml = Milliliter
mM = Millimol
mRNA = messenger RNA
mtDNA = mitochondriale DNA
mtDNA4977 = 4977 Basenpaar common deletion
n = Gesamtmenge
N = Nabelschnur
nDNA = nukleäre DNA
ng = Nanogramm
nm = Nanometer
NTC = negative template control (Negativkontrolle)
NTH 1 = Endonuklease III Homologe
n.v. = nicht vorhanden
Ori = origin of replication (Replikationsursprung)

OriH = origin of replication / Heavy strand
OriL = origin of replication / Light strand
o.g. = oben genannt
OXPHOS = Oxidative Phosphorylierung
P = Plazenta
PCR = Polymerase Kettenreaktion
pg = Pikogramm
pmol = Pikomol
R = Reverse
r2 = Korrelationskoeffizient
rfu = relative Fluoreszenzeinheit
rpm = rotation per minute
RNA = Ribonukleinsäure
ROS = reactive oxygen species
rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure
RT = Raumtemperatur
RT-PCR = Real-time PCR
sek. = Sekunde
S-H = Schleswig-Holstein
SM = Skelettmuskel
sog. = sogenannte
STR = short tandem repeat
T = Thymin
Taq = Thermos aquaticus
TBE = Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE = Tris / HCL-EDTA-Puffer
TMAC = Tetramethylammoniumchlorid
Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA = transfer Ribonukleinsäure
u.a. = unter anderem
UDG = Uracil-DNA-Glykosylase
upm = Umdrehungen pro Minute
UV = Ultraviolett
V = Volt

WHO = World Health Organization

wtDNA = Wildtyp der DNA

wt = Wildtyp

Symbole: % = Prozent, ∞ = unendlich

8. LITERATUR

Aldrovandi G.M.; Chu C.; Shearer W.T.; Li D.; Walter J.; Thompson B.; McIntosh K.; Foca M.; Meyer W.A.; Ha B.F.; Rich K.c.; Moye J.; (2009)
Antiretroviral exposure and lymphocyte mtDNA content among uninfected infants of HIV-1-infected women
Pediatrics: 124; e1189-e1197

Ames B.N.; Shigenga M:K.; Gold L.S. (1993)
DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis
Environmental Health Perspectives: 101 (5); 35-44

Anderson S.; Bankier A.T.; Barrell B.G.; de Bruijn M.H.L.; Coulson A.R.; Drouin J.; Eperon I.C.; Nierlich D.P.; Roe B.A.; Sanger F.; Schreier P.H.; Smith A.J.H.;; Staden R.; Young I.G.; (1981)
Sequence and organization of the human mitochondrial genome
Nature: Vol.290; 457-465

Arnaudo E.; Dalakas M.; Shanske S.; Moraes C.T.; DiMauro S.; Schon E.A.; (1991)
Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy
The Lancet: Vol.337; 508-510

Bai R.-K.; Wong L.-J.C.; (2005)
Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletions, depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease
Journal of Molecular Diagnostics: Vol.7; 613-622

Ballinger S. W.; Boudier T.G.; Davis G.S.; Judice S.A.; Nicklas J.A.; Albertini R.J.; (1996)
Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking
Cancer Research: 56; 5692-5697

Bank C.; Soulimane T.; Schröder J.M.; Buse G.; Zanssen S.; (2000)

Multiple deletions of mtDNA remove the light strand origin of replication

Biochemical and Biophysical Research Communications: 279; 595-601

Barret B.; Tardieu M.; Rustin P.; Lacroix C.; Chabrol B.; Desguerre I.; Dollfus C.;
Mayaux M-J.; Blanche S.; (2003)

Persistent mitochondrial dysfunction in HIV-A-exposed but uninfected infants: clinical screening in a large prospective cohort

AIDS 2003: Vol.17 No12; 1769-1785

Beckmann K. B.; Ames B. N.; (1998)

The Free Radical Theory of Aging Matures;

Physiological Reviews: 78; 547-581

Benbrik E.; Charioz P.; Bonavaud S.; Ammi-Said M.; Frisdal E.; Rey C.; Gherardi R.;
Barlovart-Meimon G.; (1997)

Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddl) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells

Journal of Neurological Sciences: 149; 19-25

Bialkowska A.; Bialkowski K.; Gerschenson M.; Diwan B.A.; Jones A.B.; Olivero
O.A.; Poirier M.C.; Anderson L.M.; Kasprzak K.S.; Sipowicz M.A.; (2000)

Oxidative DNA damage in fetal tissue after transplacental exposure to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)

Carcinogenesis: Vol.21 (5): 1059-1062

Birch-Machin M.A.; Tindall M.; Turner R.; Haldane F.; Rees J.L.; (1998)

Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo rather than chronologic aging

The Journal of investigate dermatology: 110; 149-152

Blanche S.; Tardieu M.; Benhammou V.; Warszawski J.; Rustin P.; (2006)

Mitochondrial dysfunction following perinatal exposure to nucleoside analogues

AIDS: 20; 1685-1690

Blanche S.; Tardieu M.; Rustin P.; Slama A.; Barret B.; Firtion G.; Ciraru-Vigneron N.; Lacroix C.; Rouzioux C.; Mandelbrot L.; Desguerre I.; Rötig A.; Mayaux M-J.; Delfraissy J-F.; (1999)

Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues

The Lancet: Vol.354; 1084-1089

Bouhours-Nouet N.; May-Panloup P.; Coutant R.; de Casson F.B.; Descamps P.; Douay O.; Reynier P.; ritz P.; Malthièry Y.; Simard G. (2005)

Maternal smoking is associated with mitochondrial DNA depletion and respiratory chain complex III deficiency in placenta

The American Physiological Society: Endocrinology and Metabolism: 288; 171-177

Brogly S.B.; Ylitalo N.; Mofensen L.M.; Oleske J.; Dyke R.V.; Crain M.J.; Abzug M.J.; Brady M.; Jean-Philippe P.; Hughes M.D.; Seage G.R.; (2007)

In utero nucleoside reverse transcriptase inhibitor exposure and signs of possible mitochondrial dysfunction in HIV-uninfected children

AIDS 2003: 21; 929-938

Buonaguro L.; Barillari G.; Chang H. K.; (1992)

Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines

J Virol.; 66; 7159-7167

Casula M.; Vrisekoop N.; Wit F.w.; de Bear M.P.; de Ronde A.; Miedema F.; Reiss P.; (2007)

Mitochondrial DNA decline in T cells of HIV-1 seroconverters may be dependent on immune activation

The Journal of Infectious Diseases: 196; 371-376

Chen Ch.; Vazquez-Padua M.; Cheng Yc.; (1991)

Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogs on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity.

Mol Pharmacol. 1991: 39; 625-628

Corral-Debrinski M.; Horton T.; Lott M.T.; Shoffner J.M.; Flint Beal M.; Wallace D.C.; (1992)

Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age

Nature genetics: Vol. 2; 324-329

Cortopassi G.A.; Arnheim N.; (1990)

Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans

Nucleic Acid Research: Vol. 18 No.23; 6927-6933

Cortopassi G.A.; Shibata D.; Soong N.-w.; 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 USA: Vol.89; 7370-7374

Côté H.C.F.; Brumme Z.L.; Craib K.J.P.; Alexander C.S.; Wynhoven B.; Ting L.; Wong H.; Harris M.; Harrigan P.R.; O'Shaughnessy M.V.; Montaner S.G.; (2002)
Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients

The New England Journal of Medicine: Vol.346 No.11; 811-820

Côté H.C.F.; Raboud J.; Bitnun A.; Alimenti A.; Money D.M.; Maan E.; Costei A.; Gadawski I.; Doing C.; Read s.; shen S.; Harrigan P.R.; Burdge D.R.; King s.M.; Forbes J.C.; (2008)

Perinatal exposure to antiretroviral therapy is associated with increased blood mitochondrial DNA levels and decreased mitochondrial gene expression in infants

The Journal of Infectious Diseases: 198; 851-859

Culnane M.; Fowler M.G.; Lee s.s.; (1999)

Lack of long-term effects of in utero exposure to Zidovudine among uninfected children born to HIV-infected women

JAMA: Vol.281 No.2; 151-157

Dalakas M.C.; Illa I.; Pezeshkpour G.H.; Laukaitis J.P.; Cohen B.; Griffin J.L. (1990)
Mitochondrial myopathy caused by long-term Zidovudine
The New England Journal: 322; 1098-1105

Divi R.L.; Einem T.L.; Fletcher S.L.; (2010)
Progressive mitochondrial compromise in brains and livers of primates exposed in utero to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs).
Toxicol Sci.; 118; 191-201

Divi R.L.; Leonard S.L.; Walker B.L.; (2007)
Erythrocebus patas monkey offspring exposed perinatally to NRTIs sustain skeletal muscle mitochondrial compromise at birth and at 1 year of age
Toxicol Sci.; 99; 203-2013

Divi R.L.; Leonard S.L.; Kuo M.M.; Nagashima K.; Thamire C.; Claire M.C.S.; Wade N.A.; Walker V.E.; Poirier M.C.; (2007)
Transplacentally exposed human and monkey newborn infants show similar evidence of nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity
Environmental and Molecular Mutagenesis: 48; 201-209

Divi R.L.; Walker V.E.; Wade N.A.; Nagashima K.; Seolkopf S.K.; Adams M.E. Nesel C.J.; O'Neill J.P.; Abrams E.J.; Poirier M.C.; (2004)
Mitochondrial damage and DNA depletion in cord blood and umbilical cord from infants exposed in utero to Combivir
AIDS 2004: 18; 1013-1021

Fromenty B.; Grimbert S.; Mansouri A.; Beaugrand M.; Erlinger S.; Rotig A.; Pessayre D.; (1995)
Hepatic mitochondrial DNA deletion in alcoholics: association with microvesicular steatosis
Gastroenterology; 108 (1); 193-200

Fahn H. J.; Wang L.S.; Kao S.H.; Huang M.H.; Wie Y.H.; (1998)

Smoking-associated mitochondrial DNA mutations and lipid peroxidation in human lung tissues

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Dec. 19; 901-909

Gerschenson M.; Poirier M.; (2000)

Fetal patas monkeys sustain mitochondrial toxicity as a result of in utero zidovudine exposure.

Ann N Y Acad Sci. 2000; 918; 269-281

Gingelmaier A.; Grubert T.A.; Kost B.P.; Setzer B.; Lebrecht d.; Mylonas I.; Mueller-Hoecker J.; Jeschke U.; Hiedl S.; Friese K.; Walker U.A.; (2009)

Mitochondrial toxicity in HIV type-1-exposed pregnancies in the era of highly active antiretroviral therapy

International Medical Press: 14; 331-338

Harman D.; (1956)

Aging a theory based on free radical and radiation chemistry;

Journal of Gerontology: 11; 298-300

Hendrickson S.L.; Hutcheson H.B.; Ruiz-Pesini E.; Poole J.C.; Lautenberger J.; Sezgin E.; Kingsley L.; Goedert J.J.; Vlahov D.; Donfield S.; Wallace D.c.; O'Brien S.J.; (2008)

Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression

AIDS 2008: 22(18); 2429-2439

Holland P.M.; Abramson R.D.; Watson R.; Gelfand D.H.; (1991)

*Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus**

Proceedings of the National Academy of Sciences USA: Vol.88; 7276-7280

Holt I.J.; Harding A.e.; Morgan-Hughes J.A.; (1988)

Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies

Nature: Vol.331; 717-719

- Iwai K.;** Iwamura Y.; Yamashita S.; Wadano Y.; Mesaki N.; (2006)
Effect of tea catechin on mitochondrial DNA 4977-bp deletions in human leukocytes
Mutation Research: 595; 191-195
- Jackson D.P.;** Lewis F.A.; Taylor G.R.; Boylston A.W.; Quirke P.; (1990)
Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction
Journal of Clinical Pathology: 43; 499-504
- Kao S.-H.;** Chao H.-T.; Wei Y.-H.; (1995)
Mitochondrial deoxyribonucleic acid 2977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm
Biology of Reproduction: 52; 729-736
- Kitagawa T.;** Suganuma N.; Nawa A.; Kikkawa F.; Tanaka M.; Ozawa T.; Tomoda Y.; (1993)
Rapid Accumulation of Deleted Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid in Postmenopausal Ovaries;
Biology of Reproduction 49; 730-736
- Kline E.R.;** Bassit L.; Hernandez-Santiago B.I.; Detorio M.A.; Liang B.; Kleinhenz D.J.; Walp E.R.; Dikalov S.; Jones D.P.; Schinazi R.F.; Sutliff R.L.; (2008)
Long-term exposure to AZT, but not d4T, increases endothelial cell oxidative stress and mitochondrial dysfunction
Cardiovascular Toxicology: 9: 1-12
- Koch H.;** Wittern K.P.; Bergemann J.; (2001)
In human keratinocytes the common deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation
J Invest Dermatol. Oct; 117(4); 892-7
- Lee H.-C.;** Pang C.-Y.; Hsu H.-S.; Wie Y.-H.; (1994)
Differential accumulations of 4977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing
Biochimica et Biophysica Acta: 1226; 37-43

Lee H.-C.; Lim M.L.R.; Lu C.-Y.; Liu V.W.S.; Fahn H.-J.; Zhang C.; Nagley P.; Wei A.-H.; (1999)

Concurrent increase of oxidative DNA damage and Lipid Peroxidation together with Mitochondrial DNA Mutation in Human Lung Tissue During Aging – Smoking Enhances Oxidative Stress on the Aged Tissues;

Archives of Biochemistry and Biophysics: Vol. 362; No. 2; 309-316

Lee H.-C.; Wei Y-H.; (2001)

Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging

Biogerontology: 2; 231-244

Lee H.-C.; Wei Y-H.; (2005)

Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37; 822-834

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

Mitochondrial DNA depletion, oxidative stress, and mutation: mechanisms of dysfunction from nucleoside reverse transcriptase inhibitors

Laboratory Investigation: Vol.81 No.6; 777-790

Lewis W.; Day B.J.; Copeland W.C.; (2003)

Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective

Nature: Vol.2; 812-822

Maagaard A.; Holberg-Peterson M.; Kvittingen E.A.; Sandvik L.; Bruun J.N.; (2006)

Depletion of mitochondrial DNA copies/cell in peripheral mononuclear cells in HIV-1-infected treatment-naïve patients

HIV Medicine: 7; 53-58

Maagaard A.; Holberg-Peterson M.; Levgarden G.; Holm M.; Petterson F.O.; Kvale D.; (2008)

Distinct mechanisms for mitochondrial DNA loss in T and B lymphocytes from HIV-infected patients exposed to nucleoside reverse-transcriptase inhibitors and those naïve to antiretroviral treatment

The Journal of Infectious Diseases: 198; 1474-1481

Martin F.; Brown C.E.; Matthews-Davis N.; Reardon J.E.; (1994)

Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis

Journal of Antimicrobial Chemotherapy: Vol.38 No.12; 2743-2749

Martin F.; Taylor G.P.; (2009)

The safety of highly active antiretroviral therapy for the HIV-positive pregnant mother and her baby: is the more the merrier?

Journal of Antimicrobial Chemotherapy: 64; 895-900

McComsey G.; Bai R.-K.; Maa J.-F.; Seekins D.; Wong L.-J.; (2005)

Extensive investigations of mitochondrial DNA genome in treated HIV-infected subjects

The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome: Vol.39 No.2; 181-188

McComsey G.; Kang M.; Ross A. C.; Lebrecht D.; Livingston E.; Melvin A.; Jitti J.; Cohn S.E.; Walker U.A.; (2008)

Increased mtDNA levels without change in mitochondrial enzymes in peripheral blood mononuclear cells of infants born to HIV-infected mothers on antiretroviral therapy

HIV Clinical Trials: 9(2); 126-136

Meissner C.; Mohamed S.A.; Klueter H.; Hamann K.; von Wurmb N.; Oehmichen M.; (2000)

Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system

Forensic Science Journal: 113; 109-112

Miro O.; López S.; Martínez E.; (2004)

Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals

Clin Infect Dis.; 39; 710-716

Mofensen L.M.; Munderi P.; (2002)

Safety of antiretroviral prophylaxis of perinatal transmission for HIV-infected pregnant women and their infants

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: 30; 200-215

Mohamed S.A.; Wesch D.; Blumenthal A.; Bruse P.; Windler K.; Ernst M.; Kabelitz D.; Oehmichen M.; Meissner C.; (2004)

Detection of the 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells

Experimental Gerontology: 39: 181-188

Mohamed S.A.; Hanke T.; Erasmi A.W.; Bechtel M.J.F.; Scharfschwerdt M.; Meissner C.; Sievers H.H.; Gosslau A.; (2006)

Mitochondrial DNA deletions and aging heart

Experimental Gerontology 41: 508-517

Montoya J.; Ojala D.; Attardi G.; (1981)

Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs

Nature: Vol.290; 458-465

Münscher C.; Rieger T.; Müller-Höcker J.; Kadenbach K.; (1993)

The point mutation of mitochondrial DNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages;

FEBS Letters: 317 (1-2); 27-30

Olivetta E.; Percario Z.; Fiorucci G.; (2003)

HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation

J Immunol.; 170; 1716-1727

Papiha S.S.; Rathod H.; Briceno I.; Pooley J.; Datta H.K.; (1998)

Age related somatic mitochondrial DNA deletions in bone

Clinical Pathology: 51; 117-120

Poirier M.C.; Divi R.L.; Al-Harhi L.; Olivero O.a.; Nguyen V.; Walker B.; Landay A.L.;
Walker V.E.; Charurat M.; Blattner W.A.; (2003)

Long-term mitochondrial toxicity in HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: 33; 175-183

Pornprasert S.; Faye A.; Mary J.Y.; (2006)

Down modulation of TNF-alpha mRNA placental expression by AZT used for the prevention of HIV-1 mother-to-child transmission.

Placenta 2006; 27; 989-995

Richter C.; (1995)

Oxidative Damage to mitochondrial DNA and its relationship to aging;

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology: Vol. 27 (7); 647-653

Saba J.; Haverkamp G.; Gray G.; McIntyre J.; Mmiro F.; Ndugwa C.; Coovadia H.M.;
Moodley J.; Kilewo C.; Massawe A.; Kituuka P.; Okong P.; von Briesen H.; Goudsmit
J.; Biberfeld G.; Grulich A.; Weverling G.J.; (2002)

efficacy of three short-course regimens of zidovudine and lamivudine in preventing early and late transmission of HIV-1 from mother to child in Tanzania, South Africa, and Uganda (Petra study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial

The Lancet: Vol.359; 1178-1186

Scott G.B.; (2005)

Perinatal exposure to antiretroviral agents: risks and benefits

American Journal of Neuroradiology: 26; 689-692

Scruggs E.R.; Dirks Naylor A.J.; (2008)

Mechanisms of Zidovudine-induced mitochondrial toxicity and myopathy

Pharmacology: 82; 83-88

Shiramizu B.; Shikuma K.M.; Kamemoto L.; Gerschenson M.; Erdem G.; Pinti M.; Cossarizza A.; Shikuma C.; (2003)

Placenta and cord blood mitochondrial DNA toxicity in HIV-infected women receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors during pregnancy

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: 32; 370-374

Simonetti S.; Chen X.; DiMauro S.; Schon E.A.; (1992)

Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR

Biochimica et Biophysica Acta: 1180; 113-122

Storm T.; Rath S.; Mohamed S.A.; Bruse P.; Kowald A.; Oehmichen M.; Meissner C.; (2002)

Mitotic brain cells are just as prone to mitochondrial deletions as neurones: a large – scale single-cell PCR study of the human caudate nucleus;

Experimental Gerontology: 37 (12); 1389-1400

Suematsu N.; Tsutsui H.; Wen J.; (2003)

Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes.

Circulation 2003; 107; 1418-1423

Suliman H.B.; Welty-Wolf K.E.; Carraway M.S.; (2005)

Toll-like receptor 4 mediates mitochondrial DNA damage and biogenic responses after heat-inactivated E. coli.

FASEB J.; 19; 1531-1533

Taanman J.-W.; (1999)

the mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication

Biochimica et Biophysica Acta: 1410; 103-123

Taylor R. W.; Turnbull D.M.; (2005)

Mitochondrial DNA mutations in human disease

Nature Reviews Genetics: 6 (5); 389-402

Tischleder A.; (2008)

Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials und der Apoptoserate peripherer mononukleärer Blutzellen HIV-positiver, bisher nicht antiretroviral behandelter Patienten

Medizinische Poloklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Torres S.M.; Walker D.M.; McCash C.L.; Carter M.M.; Ming J.; Cordova E.M.; Pons R.M.; Cook Jr. D.L.; Seilkop S.K.; Copeland W.C.; Walker V.E.; (2009)

Mutational analysis of the mitochondrial tRNA genes and flanking regions in umbilical cord tissue from uninfected infants receiving AZT-based therapies for prophylaxis of HIV-1

Environmental and Molecular Mutagenesis: 50; 10-26

Venhoff N.; Walker U.A.; (2006)

Mitochondrial disease in the offspring as a result of antiretroviral therapy

Medizinische Universitätsklinik Freiburg: Department of Rheumatology and Clinical Immunology

von Wurmb-Schwark N.; Higuchi R.; Fenech A.P.; Elfstroem C.; Meissner C.; Oehmichen M.; Cortopassi G.A.; (2002)

Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR

Forensic Science International: 126; 34-39

von Wurmb N.; Oehmichen M.; Meissner C.; (1998)

Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and post-mortem blood

Mutation Research: 422; 247-254

von Wurmb-Schwark N.; Ringleb A., Gebühr M., Simeoni E.; (2005)

Genetic analysis of modern and historical burned human remains.

Anthropologischer Anzeiger, 63: 1-12

von Wurmb-Schwark N.; Ringleb A.M Schwark T.; Broese T.; Weirich S.; Schlaefke D.; Wegener R.; Oehmichen M.; (2008)

The effect of chronic alcohol consumption on mitochondrial DNA mutagenesis in human blood

Mutat Res. 2008 Jan 1; 637(1-2); 73-9

von Wurmb-Schwark N.; Schwark T.; Caliebe A.; Drenske C.; Nikolaus S.; Schreiber S.; Nebel A.; (2010)

Low level of mtDNA (4977) deletion in blood of exceptionally old individuals

Mecg Ageing Dev. 2010 Mar; 131(3); 179-84

Wallace D. J.; Singh G.; Lott M. T.; Hodge J.A.; Schnurr T.G.; Lezza A.M.; Elsas L. J. 2nd, Nikoskelainen EK; (1988)

Mitochondrial DNA mutation associated with Leber`s hereditary optic neuropathy

Science: 242 (4884); 1427-1430

Wallace D.C.; (1992 a)

Mitochondrial Genetics: A paradigm for aging and degenerative disease?

Science: 256; 628-632

Wallace D.C.; (1992 b)

Diseases of the mitochondrial DNA

Annual Reviews of Biochemistry: 61; 1175.1212

Wallace D.C.; Shoffner J.M.; Trounce L.; Brown M.D.; Ballinger S.W.; Corral-Debrinski M.; Horton T.; Jun A.S.; Lott MT; (1995)

Mitochondrial DNA mutations in human degenerative disease and aging

Biochimica et Biophysica Acta: 1271; 141-151

Wendelsdorf K.V.; Song Z.; Cao Y.; Samuels D.C.; (2009)

An analysis of enzyme kinetics data for mitochondrial DNA stran termination by nucleoside reverse transcription inhibitors

PLOS Computational Biology: Vol.5; 1-11

Bücher:

Alberts B.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Walter P.;

Molekularbiologie der Zelle

Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 4.Auflage; (2003)

Diedrich K.; Holzgreve W.; Jonat W.; Schultze-Mosgau A.; Schneider K.-T. M.;

Weiss J. M.;

Gynäkologie und Geburtshilfe

Heidelberg: Springer Verlag; (2007)

Fritsch H.; Kühnel W.;

Taschenatlas Anatomie 2 Innere Organe

Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 9. Auflage; (2005)

Gruber S.;

Basics – Gynäkologie und Geburtshilfe

München: Urban & Fischer Verlag; 2. Auflage; (2007)

Herdegen T.; Böhm R.; Cimin-Bredée N.; Culman J.; Gohlke P.; Ley L.; Luippold G.;

Ufer M.; Wätzig V.

Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie

Stuttgart: Georg Thieme Verlag; (2008)

Hof H.; Dörries R.;

Duale Reihe – Medizinische Mikrobiologie

Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 3. Auflage; (2005)

Mutschler E.; Geisslinger G.; Kroemer H. K.; Ruth P.; Schäfer-Korting M.;

Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie

Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; (2008)

Schütt C.; Bröker B.;

Grundwissen immunologie

Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; (2009)

Dissertationen:

Schwark T.; (2002)

Quantifizierung 4977 bp deletierter humaner mitochondrialer DNA in fünf topographisch verschiedener Hirnregionen;

Kiel: Aus dem Institut für Rechtsmedizin der medizinischen Universität zu Lübeck

Röpke M.; (2008)

Mitochondriale DNA-Mutagenese im Cerebellum von Alkoholkranken

Kiel: Aus dem Institut für Rechtsmedizin der medizinischen Universität zu Kiel

Internetseiten:

Hivbuch; (2010)

<http://www.hivbuch.de>

Stand: 16.09.2011

Medizinische Genetik; (2011)

<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=2001>

Stand: 12.09.2011

Mitomap; (2011)

A human mitochondrial genome database;

<http://www.mitomap.org>

Stand: 13.09.2011

Un aids; (2010)

http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm

Stand: 16.09.2011

9. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde von Februar 2010 bis März 2013 am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt.

Ich möchte mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Frau PD Dr. rer. nat. Nicole von Wurmb-Schwark für die Bereitstellung des Themas und die nette Betreuung während der gesamten Zeit.
- Prof Dr. med. Dr. jur. Hans-Jürgen Kaatsch für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin durchführen zu können.
- Meinem Ehemann Domingos Garcia und meinen Eltern Gabriele und Alfred Katerna für die tägliche Unterstützung und Motivation während des gesamten Studiums.
- Allen Doktoranden und Diplomanden im Labor für die guten Tipps und Anregungen, sowie die nette Atmosphäre. Ein ganz besonderer Dank geht an die Doktorandin Dipl. Biol. Melanie Harder für ihre fortlaufende Hilfe während der gesamten Zeit.
- Allen Mitarbeitern am Institut für Rechtsmedizin für die freundliche Hilfe und die netten Stunden.

10. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltliche entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

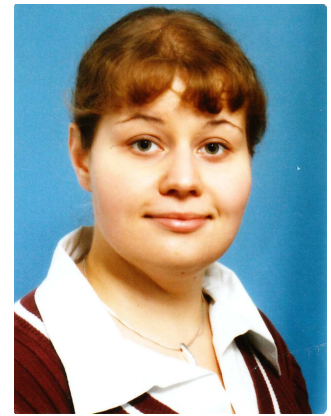
Mit der Einstellung dieser Arbeit in die Bibliothek der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bin ich einverstanden.

Kiel, März 2013-03-03

Angela Katerna

11. LEBENS LAUFPersönliche Angaben

Name: Angela Melanie Katerna
 Geburtsdatum: 19.03.1985
 Geburtsort: Nürnberg
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: verheiratet

Schule

1991-1995 Grundschule Igensdorf
 1995-2004 Gymnasium Eckental in Eschenau mit
 Abitur am 25.06.2004

Studium

April 2005 – September 2007 Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt an
 der Georg-August-Universität Göttingen
 mit Abschluss des Ersten Abschnitts der
 Ärztlichen Prüfung am 07.09.2007
 April 2008 – Mai 2012 Humanmedizin, klinischer Abschnitt an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit
 Abschluss des Zweiten Abschnitts der
 Ärztlichen Prüfung am 15.05.2012
 16.05.2012 Erlangung der Approbation als Ärztin

Arbeit

seit 01.11.2012 Assistenzärztin in der Weiterbildung zum
 Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe
 in der Klinik Neustadt an der Aisch