

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. M. Oehmichen

**Entwicklung humanspezifischer
Oligonukleotidsonden zur forensischen
Spurenanalyse und Quantifizierung der
mitochondralen DNA in humanen Geweben.**

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der medizinischen Fakultät -
vorgelegt von
Thomas Frahm
aus Rostock

Lübeck 2005

***In tiefer Dankbarkeit:
Dem Urknall***

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	
1.1 Mitochondrien	5
1.2 Aufbau der mitochondrialen DNA	6
1.3 Die Speziespezifität der mtDNA	8
1.4 Die Bedeutung der mtDNA für forensische Untersuchungen	10
1.5 Bedeutung der mtDNA-Degeneration	12
1.6 MtDNA-Kopienzahl in Geweben und im Alter	13
2 Fragestellung	15
3 Material und Methoden	
3.1 Auswahl der Sondensequenz	16
3.2 Sondensequenz	17
3.3 Hybridisierungsbedingungen	18
3.4 Auswahl des Detektionssystems	19
3.5 Phenol-Chloroformextraktion	19
3.6 DNA Extraktion	21
3.7 mtDNA-Standard	22
3.8 Agarosegelelektrophorese und Southern Blot	22
3.9 Restriktionsspaltung des PCR-Produktes	23
3.10 Photometrische Quantifizierung	24
3.11 Fluorometrische Quantifizierung	24
3.12 Der Slot Blot	25
3.13 Quantifizierung der Kern-DNA	25
3.14 Dot Blot	26
3.14.1 Denaturierung	26
3.14.2 DNA-Denaturierungen für den Dot Blot	27
3.15 Optimierung der Sensitivitätsgrenze der Sonden Hummit 1 und 2 durch Modifikation der Detektion	28

3.16 Hybridisierungsbedingungen von Hummit 1 und 2	28
3.16.1 Sensitivitätserhöhung	28
3.16.2 Humanspezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2	29
3.16.3 Bedingungen, unter denen die Spezifitätsversuche von Hummit 1 und Hummit 2 ermittelt wurden	30
3.17 Steigerung der Humanspezifität der Sonde Hummit 2	30
3.18 MtDNA-Spezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2	30
3.19 Standardprotokoll für den Slotblot der mtDNA	31
3.20 MtDNA-Quantifizierung	34
3.21 Berechnung der mtDNA-Kopienzahl	34
3.22 Statistische Methoden	35
3.23 Material und Geräte	35
3.24 Humane und Tierische Proben	36
 4 Ergebnisse	
4.1 DNA-Denaturierungen für den Dot Blot	37
4.2 Optimierung der Sensitivitätsgrenze der Sonden Hummit 1 und 2 durch Modifikation der Detektion	39
4.3 Hybridisierungsbedingungen von Hummit 1 und 2	40
4.3.1 Sensitivitätserhöhung	40
4.3.2 Humanspezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2	42
4.3.3 Steigerung der Humanspezifität der Sonde Hummit 2	44
4.4 MtDNA-Spezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2	44
4.5 MtDNA-Quantifizierung	45
 5 Diskussion	
5.1 mtDNA-Standard	49
5.2 Vorquantifizierung	50
5.3 Sondensensitivität	51
5.4 Die Sensitivität der Sonden im Vergleich	52
5.5 Spezifität der Methode	54
5.6 Sondentauglichkeit	57

5.7 Quantifizierung	58
5.8 MtDNA-Quantifizierungsstudie	61
5.9 Empfehlungen für die Entwicklung hoch spezifischer Sonden	66
6 Zusammenfassung	67
Anhang	
A Geräte	
A.0.1 Slot Blot	69
A.0.2 DNA-Extraktion	69
A.0.3 DNA-Messung	69
A.0.4 Gel-Elektrophorese	69
A.0.5 PCR	69
A.1 Material	70
B Abkürzungsverzeichnis	72
Literaturverzeichnis	73

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen mit einer Doppelmembran und einer eigenen DANN, der mitochondrialen (mt) DNA. Sie sind 2-4 μm lang und haben einen Durchmesser von ca. 1 μm . In der Abbildung 1.1 ist der strukturelle Aufbau eines Mitochondriums dargestellt.

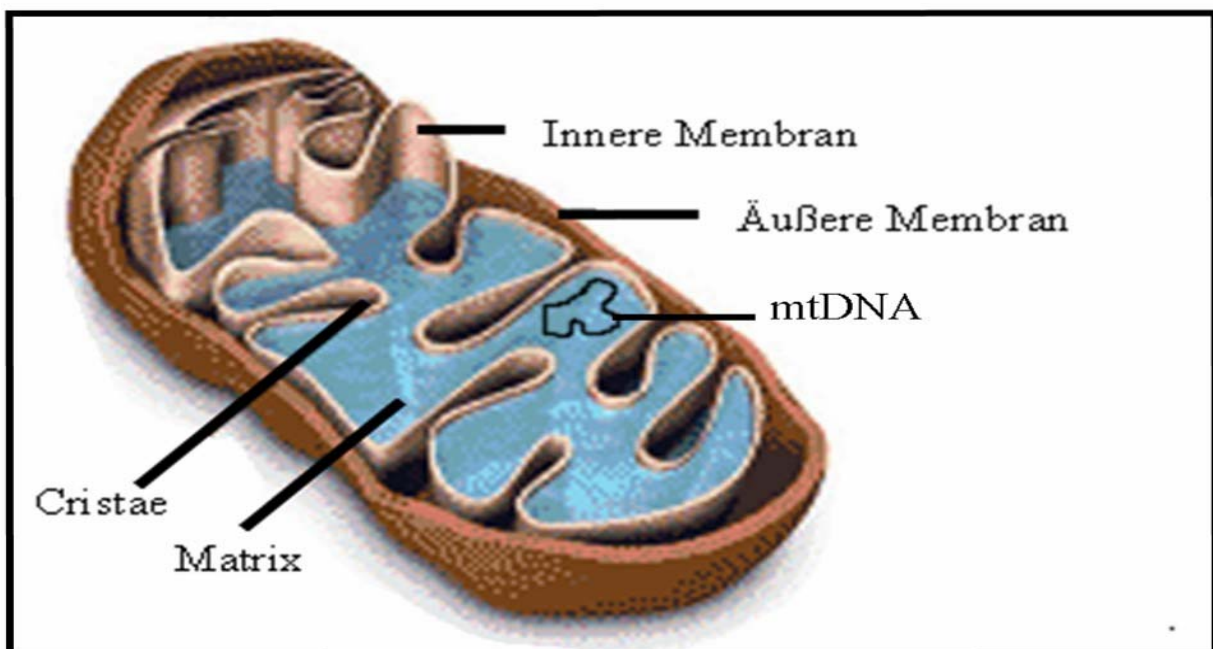


Abbildung 1.1: Vereinfachter struktureller Aufbau eines Mitochondriums (modifiziert nach [41])

Die wesentliche Funktion der Mitochondrien ist die ATP-Synthese. ATP (Adenosintriphosphat) ist der Energielieferant für die meisten Stoffwechselprozesse in der Zelle. Die Synthese des ATP erfolgt durch die Atmungskettenenzyme in der inneren Mitochondrienmembran. Während der ATP-Produktion kommt es im Matrixraum zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die die ebenfalls im Matrixraum befindliche mitochondriale DNA schädigen können.

Mitochondrien sind in verschiedenen Zelltypen verschieden angeordnet, in Herzmuskelzellen liegen sie z.B. zwischen den Myofibrillen und in Spermien eng um die Geißel herum [4]. Die unterschiedliche Anordnung der Mitochondrien ist aus funktioneller Sicht sinnvoll, da sie sowohl in den Herzmuskelzellen als auch in den Spermien dort liegen, wo viel ATP benötigt wird. Mitochondrien nehmen im zellulären Energiestoffwechsel also eine zentrale Rolle ein und ihre Funktionsfähigkeit ist essentiell für den gesamten Zellstoffwechsel. Es ist deshalb notwendig zu untersuchen, ob und welche Faktoren die Funktion der Mitochondrien beeinflussen.

1.2 Aufbau der mitochondrialen DNA

Die mitochondriale DNA (mtDNA) liegt als zirkulärer Doppelstrang vor (Abbildung 1.2), auf dem die Gene für 22tRNAs, 13 proteinkodierende Gene sowie 2 rRNA-Gene lokalisiert sind [5]. Das mitochondriale Genom hat eine Gesamtlänge von 16569 Basenpaaren (bp), deren Sequenz erstmals 1981 publiziert wurde [5]; eine neuere Sequenzierung wurde 1999 durchgeführt [6] und ist beim National Center of Biotechnology Information (NCBI) abrufbar [66]. Diese beiden Sequenzen unterscheiden sich jedoch nur in wenigen Basenpaaren. In der NCBI-Datenbank sind außerdem in der Rubrik „mitomap“ Informationen zu Deletionen, Insertionen, Punktmutationen, etc. verfügbar. Das mitochondriale Genom ist extrem kompakt strukturiert, so dass Gene z.T. ohne jegliche nichtkodierende Bereiche aneinander grenzen [5] oder sogar überlappen. Deshalb wirken sich Mutationen, Deletionen etc. häufig auch direkt auf die Stoffwechselleistung aus.

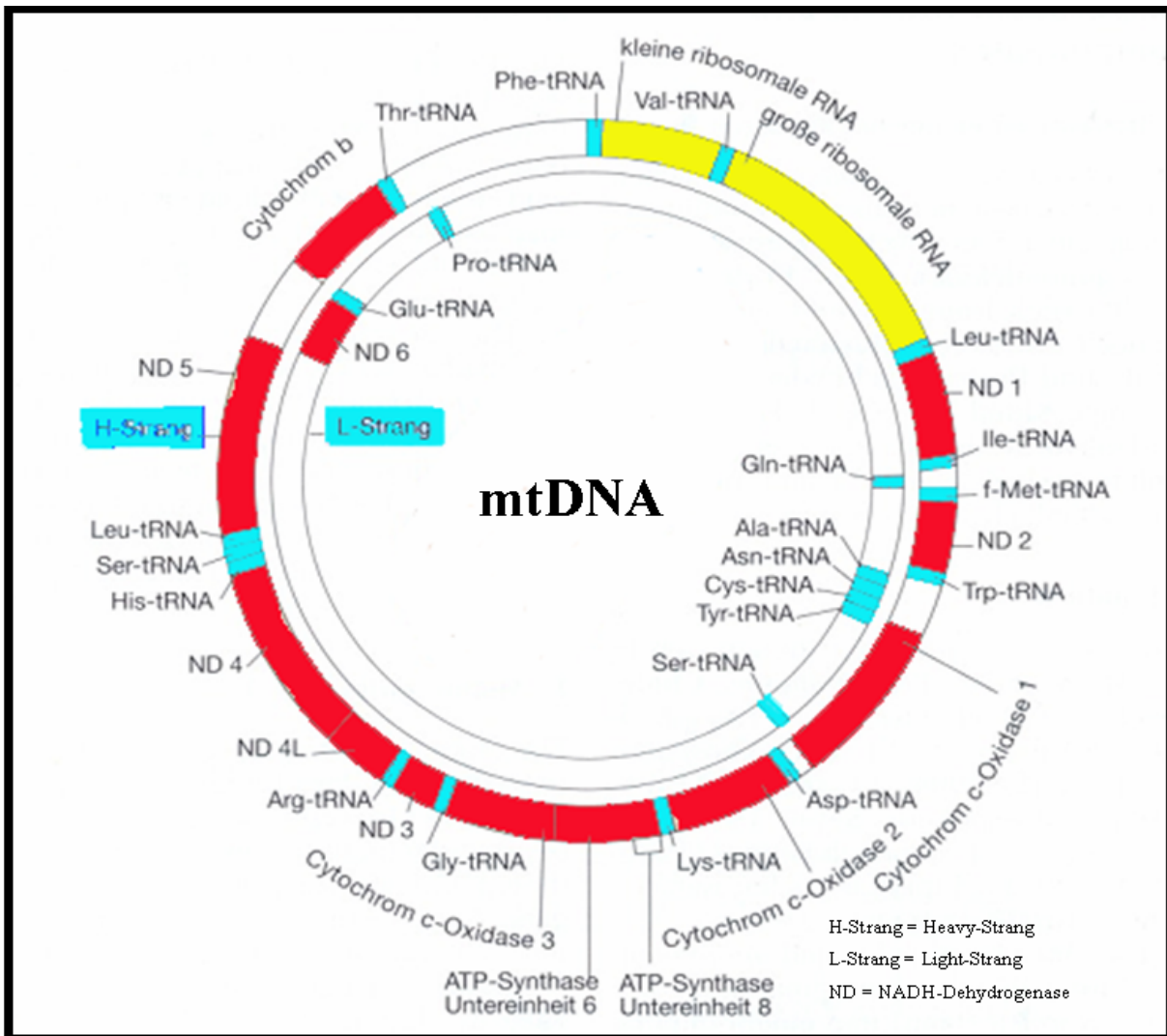


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der humanen mitochondrialen DNA (modifiziert nach [47])

Die mtDNA wird in einen H-Strang (H=heavy) und einen L-Strang (L=light) unterteilt. Diese Bezeichnungen leiten sich aus den unterschiedlichen Auftriebsgeschwindigkeiten im Caesium-Chlorid-Gleichgewichtsgradienten ab, durch den man auf Grund unterschiedlicher Dichte einen leichten von einem schweren Strang unterscheiden kann [46]. Auf der mtDNA liegt die D-Loop-Region (D=displacement), für die keine kodierende Funktion bekannt ist [5]; dieser Bereich ist eine Region von ca. 700 Nukleotiden, die bei den mtDNAs der meisten Vertebraten eine Dreistrangstruktur aufweist. Das zusätzliche DNA-Stück ist komplementär zum L-Strang [46]. Die Kontrollregion, in ihr liegt auch der D-Loop, kann man in zwei hypervariable und einen dazwischen liegenden stark konservierten Bereich

unterteilen. Die hypervariablen Regionen weisen extrem viele Punktmutationen auf [66, 64], wobei einige dieser Mutationen spezifisch für bestimmte ethnische Gruppen sind [90]. Aber auch im Vergleich mit anderen Vertebraten gibt es Unterschiede bezüglich dieser Region. Damit stellt dieser Bereich einen interessanten Sequenzabschnitt für Untersuchungen zur Artendifferenzierung und für die forensische Analyse dar.

1.3 Die Speziesspezifität der mtDNA

Die mtDNA (Abbildung 1.2) hat eine im Vergleich zur Kern-DNA hohe Mutationsrate (s.u.). Dadurch ist sie gut geeignet, um an Hand ihrer Unterschiede verschiedene evolutionäre Prozesse nachzuvollziehen. So läßt sich z.B. durch diverse Mutationen, Substitutionen, Deletionen etc. in der mtDNA die Abstammung der Polynesier [36] sowie anderer Völker nachvollziehen. Dies ist möglich, obwohl die Abspaltung dieser Völker in der näheren Vergangenheit erfolgte. Australien und Papua Neu Guinea z.B. wurden vor vermutlich 50.000 Jahren besiedelt. Trotz dieses relativ kurzen Zeitraums ist eine Unterscheidung zu den Völkern, von denen sie abstammen, möglich. Vor ca. 4,5- bis 6 Millionen Jahren [18] fand die Spaltung zwischen Mensch und Schimpansen, dem nächsten Verwandten des Menschen im Tierreich, statt (Abbildung 1.3). Nach Brown [15] beträgt die Substitutionsrate der mtDNA ca. 0,02 Substitutionen pro Basenpaar pro 1 Million Jahre. Wenn man davon ausgeht, dass 5 Millionen Jahre seit der Aufspaltung zwischen Mensch und Schimpansen vergangen sind, so müßten auf der gesamten mtDNA 1656,9 Substitutionen stattgefunden haben. Somit müßte auch Primaten-mtDNA von humaner mtDNA gut zu differenzieren sein.

Die Mutationsraten der mitochondrialen DNA weisen Unterschiede zwischen verschiedenen Sequenzabschnitten auf [74], dementsprechend ist auch die Speziesspezifität der verschiedenen Regionen der mtDNA verschieden. In den peripheren Teilen der D-Loop-Region ist die Mutationsrate der mtDNA besonders hoch. Im Displacement-Loop ist teilweise eine spezies-spezifische Evolution evident [74], in dieser Region sind humanspezifische Sequenzen vorhanden. Aufgrund dieser

Tatsachen erstellen Evolutionsforscher durch die Analyse der mtDNA Stammbäume für z.B. Säuger und andere Tiere. An Hand eines solchen Stammbaums lässt sich ableiten, dass Schimpansen und Gorillas die engsten Verwandten des Menschen sind [7].

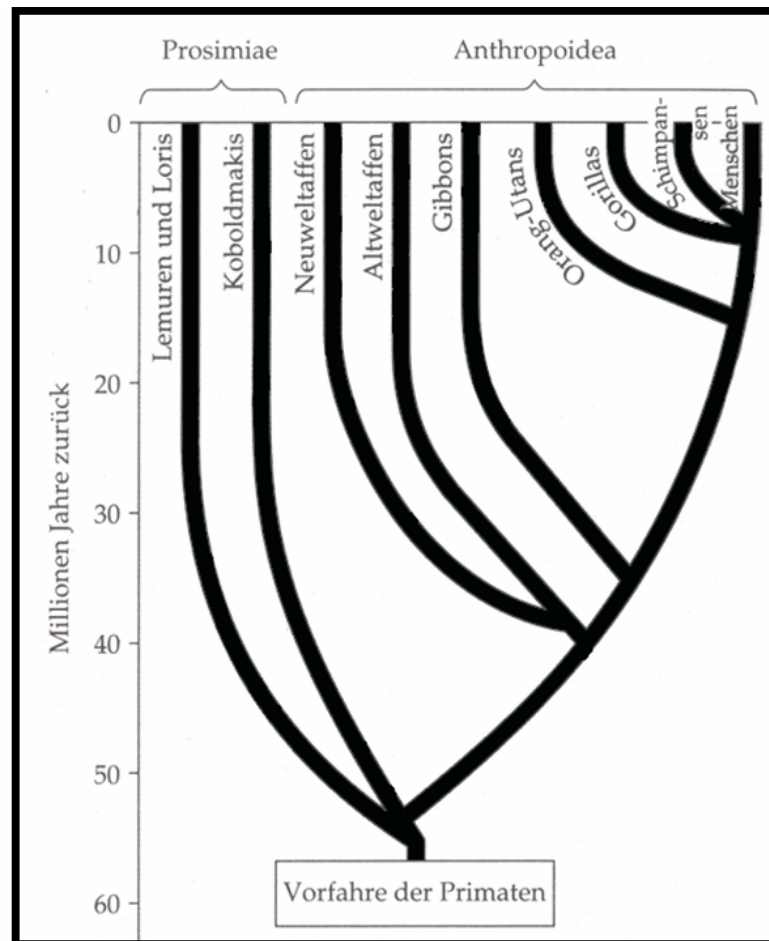


Abbildung 1.3: Primatenstammbaum mit zeitlicher Angabe der Aufspaltungen (modifiziert nach [18])

Im Gegensatz dazu ist durch die geringere Substitutionsrate und die geringere Kopienzahl der Kern-DNA davon auszugehen, dass hier wesentlich weniger humanspezifische Sequenzen vorliegen, die äquivalente Voraussetzungen für forensische Fragestellungen aufweisen, als einige Fragmente der mtDNA.

1.4 Die Bedeutung der mtDNA für forensische Untersuchungen

Kern-DNA-Analysen (DNA-Fingerprinting) sind eine häufig verwendete Methode in der Rechtsmedizin, mit der mit hoher Wahrscheinlichkeit ermittelt werden kann, ob es sich bei einem Verdächtigen um die Person handelt, deren Spuren z.B. am Tatort gefunden wurden. Neben der hohen Genauigkeit reichen außerdem geringste DNA-Mengen aus, um eine Analyse durchzuführen. Ein weiterer Vorteil von DNA als Untersuchungsmaterial ist die Widerstandsfähigkeit gegenüber diversen Umweltbedingungen, wobei diese innerhalb der verschiedenen DNA-Formen jedoch variiert. So ist die mtDNA zwar instabiler als die Kern-DNA, welche die Histone als die Stabilität unterstützende Proteinstruktur besitzt. Im Gegensatz zum Kern sind die Mitochondrien aber stabiler, wodurch die mtDNA über einen insgesamt besseren Schutz in Bezug auf degradierende Umwelteinflüsse verfügt.

Die mtDNA bietet einen weiteren erheblichen Vorteil gegenüber der nukleären DNA, denn sie liegt nicht nur einmal pro Zelle vor, sondern -abhängig vom Zelltyp- mehrere hundert- bis tausendmal. Allein das wesentlich häufigere Vorkommen der mtDNA erhöht die Chance, große und noch intakte Fragmente zu finden. Somit übersteht die mtDNA den Prozeß der Autolyse post mortem besser als die Kern-DNA [81]. Die mtDNA kann in Fällen verwendet werden, in denen nukleäre DNA nicht mehr existent oder stark degradiert ist [40].

In der rechtsmedizinischen Routine stellt sich bei Funden von Knochenfragmenten oder von Haaren am Tatort häufig die Frage, ob es sich um humanes oder tierisches Material handelt. Zur Artbestimmung ist die Analyse der Cytochrom b-Sequenz der mtDNA sehr gut geeignet. Um nicht sofort für jeden Knochenfund eine aufwendige DNA-Sequenzierung durchführen zu müssen, sollte eine Methode zur Verfügung stehen, die vorab eine Unterscheidung zwischen menschlichem und tierischem Gewebe erlaubt. Die aus Knochenmaterial extrahierte DNA weist häufig eine starke Kontamination mit Bakterien-, Insekten- oder Pilz-DNA auf. Da sich menschliche und nichtmenschliche DNA durch photometrische Methoden allein nicht unterscheiden lassen, wäre die Entwicklung einer humanspezifischen mtDNA-Sonde wichtig, um

den Anteil menschlicher DNA innerhalb eines DNA-Extraktes möglichst genau zu quantifizieren und nachfolgende Analysen zuverlässig und kostengünstig durchführen zu können. Für diese Untersuchung wäre ein Slot Blot mit einer humanspezifischen mitochondrialen Sonde optimal geeignet, da der Nachweis des humanen Ursprunges eines Knochenfragments oder Haares mittels der sehr stabilen mtDNA erfolgen würde. Im Falle eines humanen Knochenfragments erfolgt dann entweder eine Quantifizierung der humanen nukleären DNA mit anschließenden DNA-Fingerprinting oder eine Sequenzierung der mtDNA.

Wie haltbar die mtDNA in der Realität ist, zeigen verschiedene Untersuchungen auf eindrucksvolle Weise. So konnte aus einer 750 Jahre alten Leiche mtDNA extrahiert und mittels PCR ein 600 bp langes Fragment amplifiziert werden [36]. Es konnte außerdem ein 205 bp langes Fragment aus dem Extrakt eines 5450 Jahre alten Knochens [36] sowie Teile der mtDNA eines Neandertalers amplifiziert werden (Neandertaler lebten vor 300.000 bis 30.000 Jahren in Europa und im westlichen Asien) [50]. Diese Beispiele zeigen, dass die mtDNA über einen langen Zeitraum nachweisbar ist und sich daher für forensische Fragestellungen eignet. Weitere Kriterien für die forensische Anwendbarkeit von mtDNA-Analysen sind die individuelle Sequenzspezifität sowie die Anfälligkeit gegenüber einer Kontamination mit Fremd-DNA. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR sind zwar kleinste Spurenmengen ausreichend, um humane mtDNA nachzuweisen; fraglich bleibt aber diesbezüglich, ob es sich nicht um eine Kontamination handelt. Diese Frage wird immer dann relevant, wenn es sich um Spuren wie z.B. einzelne Haare handelt.

Als Alternativen zur PCR stehen andere weniger sensitive aber kontaminationsunanfälligere Methoden wie der Dot-, Slot- und Southern Blot zur Verfügung. Die forensische Untersuchung der mtDNA aus Spuren mittels Slot Blot und nichtradioaktiv markierter Oligonukleotidsonden mit hoher Spezifität ist möglich und wurde bereits für Tiere entwickelt [30]. So wurde eine katzen- sowie eine hundespezifische Sonde entwickelt, deren Nachweisgrenze bei ca. 100 pg mtDNA liegt. Für den Nachweis einzelner Haare ist die Sensitivität zwar nicht ausreichend, aber für Untersuchungen der mtDNA aus z.B. Knochenmaterial ist die Methode gut geeignet.

Verschiedene Autoren berichten über die Verwendung von mtDNA-Analysen zur Aufklärung forensischer Fälle. Die Untersuchungen der mtDNA dient sowohl zur Differenzierung zwischen verschiedenen Tieren und dem Menschen durch PCR, als auch zur Klärung der Familienzugehörigkeit verschiedener Personen [34, 35]. Die Untersuchung der Familienzugehörigkeit verschiedener Personen mittels der mtDNA ist aufgrund der überwiegend maternalen Vererbung und der hohen Sequenzvariabilität der Kontrollregion möglich. Es wurde z.B. untersucht, ob Carl Wilhelm Naundorff, der als Louis Charles, Duc de Normandie, Louis der XVII im Jahre 1845 begraben wurde, wirklich der Sohn von Marie-Antoinette, der Frau Louis des XVI, war. Hierzu verglichen Jehaes und Mitarbeiter verschiedene Sequenzen aus der Kontrollregion Region Carl Wilhelm Naundorffs mit den Sequenzen Blutsverwandter seiner angeblichen Mutter, Marie Antoinette. Dabei hatten sie festgestellt, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass Monsieur Naundorff der Sohn von Marie-Antoinette gewesen ist [42]. Diese Veröffentlichungen zeigen, dass die mtDNA-Untersuchung in der Rechtsmedizin eine vielversprechende neue Möglichkeit darstellt, deren Weiterentwicklung sinnvoll und notwendig ist.

1.5 Bedeutung der mtDNA-Degeneration für Alterung und Krankheiten des Menschen

Ein weites Spektrum von degenerativen Erkrankungen, welche Nervensystem, Herz, Muskeln, Endokrines System, Niere und Leber betreffen, konnten mit im gesamten Organismus vorhandenen mtDNA-Mutationen assoziiert werden. Diese mtDNA-Mutationen vermindern die Effektivität der oxidativen Energiegewinnung [80].

Mitochondrale Erkrankungen werden im allgemeinen maternal vererbt, z.T. folgen sie auch den Mendelschen Gesetzen, wenn die für den Defekt verantwortlichen Proteine nicht von der mtDNA sondern von der Kern-DNA kodiert werden. Viele der mit mtDNA-Schäden assoziierten Krankheiten manifestieren sich erst im späteren Verlauf des Lebens und zeigen eine Progredienz. Dies basiert vermutlich auf der verminderten Aktivität der Atmungskette in Folge des Alterungsprozesses in

Kombination mit erblich bedingten Atmungskettendefekten [90]. Das heißt, die Addition der Atmungskettendefekte führt zu einer energetischen Insuffizienz der Gewebe [90]. So konnte mit drei sogenannten „late onset“ progressiven Muskelerkrankungen eine Zunahme der somatischen mtDNA-Mutationen assoziiert werden [90].

Unabhängig davon, ob es einen Zusammenhang zwischen degenerativen Erkrankungen und mtDNA-Mutationen gibt, ist bekannt, dass es eine deutliche Degeneration der mtDNA (in Form von Mutationen, Deletionen, etc.) mit zunehmenden Alter des Menschen gibt [73]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass deletierte mtDNA in Zellkulturexperimenten schneller repliziert wird als eine komplette mtDNA und somit akkumuliert [26]. Die Akkumulation deletierter mtDNA in älteren Geweben konnte durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt werden [37]. Um die mutierte bzw. deletierte mtDNA besser untersuchen zu können, sind Methoden wie z.B. die PCR notwendig, damit man quantitativ ausreichende Mengen der mitochondrialen DNA erhält.

Für die Deletionssuche empfiehlt es sich, z.B. eine „Long PCR“ durchzuführen. Bei dieser PCR wird ein mehrere 1000 bp langes DNA-Fragment amplifiziert. Für die Detektion mitochondrialer Deletionen kann z.B. ein 16,2 kb langes Fragment verwendet werden. Bei der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung repräsentieren die verschiedenen Banden der PCR-Amplifikate, zumindest theoretisch, die in der Template-DNA enthaltenen deletierten Stränge. Um eine solche PCR relativ problemlos durchführen zu können, ist es notwendig eine konstante Template-DNA-Menge einzusetzen. Hierfür wiederum ist eine exakte Vorquantifizierung notwendig.

1.6 MtDNA-Kopienzahl in Geweben und im Alter

Mitochondrale Deletionen sind gewebespezifisch und ihre Menge korreliert mit der Schwere von mitochondrialen Dysfunktionen. Die mtDNA-Menge von Zellen wurde als 0,15- bis 1% der Masse der Kern-DNA ermittelt [21, 72]. Es wurden aber erst wenige Versuche unternommen, um die mtDNA-Menge in verschiedenen humanen Geweben

zu quantifizieren [14, 79]. Kürzlich wurde diese Fragestellung zum Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen [1, 12, 20, 65, 76], in denen eine Gewebespezifität der mtDNA-Kopienzahl gezeigt wurde. In neueren Studien wurde dann die Veränderung der mtDNA-Kopienzahl im Rahmen des Alterungsprozesses in unterschiedlichen Geweben untersucht. Diese Studien führten zu widersprüchlichen Ergebnissen [11, 10, 12, 19, 13, 27, 65]. Während einige Studien eine Zunahme der mtDNA-Kopienzahl pro diploider Kern-DNA im Alter fanden [11, 10, 54], konnte diese Veränderung von anderen Autoren nicht nachgewiesen werden [12, 65]. Bai und Mitarbeiter fanden für humane PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) eine Abnahme der mtDNA-Kopienzahl mit zunehmenden Alter; diese Reduktion konnten sie jedoch im Skelettmuskel nicht detektieren [8]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse in den verschiedenen Studien könnten durch die unterschiedlichen untersuchten Gewebe sowie die z.T. geringen Fallzahlen bedingt sein. Um diese widersprüchlichen Daten zu klären, ist es notwendig, die verschiedenen Gewebe an einem großen Kollektiv zu untersuchen.

2 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer Methode zur qualitativen und quantitativen Detektion der humanen mtDNA sein. Die Methode für diese Detektion sollte möglichst unkompliziert und schnell sein, da sie als Routinemethode im Labor weiterverwendet werden soll. Weiterhin sollten keine radioaktiven Stoffe zum Einsatz kommen. Als Methoden wurden der Slot-Blot und der Dot Blot eingesetzt. Als Massgabe für die zu erreichende Sensitivität wurden 50 pg humane mtDNA festgesetzt. Der verwendete Standard sollte möglichst gleiche chemische und physikalische Eigenschaften wie die verwendeten Proben aufweisen, da ein weiteres Ziel der Arbeit darin bestand, den prozentualen Anteil der mtDNA an der Gesamt-DNA sowie die mtDNA-Kopienzahl in verschiedenen humanen Geweben zu ermitteln. Außerdem sollte die entwickelte Methode möglichst alle Variationen deletierter humaner mtDNA detektieren können.

Neben der Quantifizierung der humanen mtDNA sollte mit der Methode eine Differenzierung humaner mtDNA von tierischer mtDNA möglich sein. Hierzu wurde erwartet, dass aufgrund der Homologievergleiche, die in mehreren Gendatenbanken durchgeführt werden sollten, keine unspezifischen Bindungen vorlagen. Die Humanspezifität sollte experimentell verifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl der Sondensequenz

Für die Wahl der Sondensequenz wurden humanspezifische mtDNA-Sequenzen ausgewählt, die in Regionen der mtDNA liegen, die wenige Mutationen und Deletionen aufweisen. Diese Bedingungen lagen nur in einem sehr eingeschränkten Bereich vor [31, 32, 63, 64].

Bezüglich der Humanspezifität sollten die Sonden möglichst wenig Homologien zu Tieren aufweisen. Besondere Beachtung fanden hier die in Deutschland lebenden Tiere, da es aus rechtsmedizinischer Sicht am sinnvollsten ist, auszuschliessen, dass Gewebe heimischer Tiere als humanes detektiert werden. Die Vorauswahl wurde mit den bekannten Sequenzen getroffen.

Aus den verbleibenden Bereichen wurden alle Regionen mit häufigen Deletionen eliminiert. Es verblieb nur der Bereich von 16086-1835 bp (nach Anderson Sequenz). Aus dieser Region wurden alle Bereiche gestrichen, bei denen mehr als dreimal dieselbe Base aufeinanderfolgte, da dies die Bindungseigenschaften der Sonde verschlechtert.

Mittels der Gendatenbank „mitomap“ [90] wurde nach Regionen gesucht, für die möglichst wenig Punktmutationen beschrieben waren. Für die „Kontroll-Region“ stand neben diesen Informationen noch zusätzlich die Untersuchung von Meyer und Mitarbeitern zur Verfügung [64]. Mittels dieser Daten war es zumindest für die Hypervariablen Region 1 und 2 (HVR1+2) möglich, Abschnitte zu finden, in denen wenige Mutationen vorliegen.

Diese Sequenzen wurden dann an den „Sequence Analysing Service“ des EMBL-Instituts in Heidelberg geschickt. Dort wurde ein Homologievergleich mit der EMBL-Datenbank durchgeführt. Nach all diesen Tests blieben nur zwei gut geeignete Regionen übrig.

Die beiden gut geeigneten Bereiche sind die Bereiche der Sonden Hummit 1 und Hummit 2, sie sollten von der theoretischen Erwartung her ausschließlich an humane

mtDNA binden, da beide Sonden mindestens eine Mutation zu allen anderen Tieren aufweisen.

Sondenbereichangabe nach der Andersonsequenz:

Sonde Hummit 1: bp 332-354 (Hybervariable Region 2)

5'-CTT AAA CAC ATC TCT GCC AAA C-3'

Sonde Hummit 2: bp 1396-1417 (12SrRNA)

5'-CTT ATG AAA CTT AAG GGT CGA-3'

3.2 Sondensequenz

Die für die Sondensequenz relevanten Kriterien wurden bereits im Kapitel 3.1 erörtert. Hier sollen nun die gewählten Sequenzen dargestellt werden.

Humanspezifität: Die nächst homologe Sequenz zur Sonde Hummit 1 stellt die der Schimpansenart *Pan troglodytes* dar. Sie besitzt vom 5'-Ende aus gezählt zwei Mutationen an Position 2 und 3; die Mutationen sind von T nach N (die Basen des *Pan troglodytes* sind im Alignment nicht angegeben), alle weiteren erfaßten Tiere weisen erheblich mehr Mutationen auf. Sonde Hummit 2 hat eine Mutation zum *Pan paniscus* und zum *Pan troglodytes*, diese liegt, vom 5'-Ende aus gezählt, an Position 11 und geht von T nach C, alle anderen Tiere, die in der Datenbank gespeichert sind, weisen zusätzliche Mutationen auf.

Mutationen und Deletionen der Sondenzielsequenzen beim Menschen:

Für die Sonde Hummit 1 sind zwei Mutationen bekannt [90]. Hummit 1 liegt nicht im dreisträngigen D-Loop-Abschnitt. Die erste Mutation ist an Position 340 [5] von C nach G und die zweite an Position 353 von C nach CC. Da sich an Position 354 ebenfalls ein C befindet, hat dies keinen Einfluss auf die Sondenbindung. Deletionen sind bisher keine bekannt [90].

Bezüglich der Zielsequenz für Hummit 2 sind sechs Mutationen und 3 Deletionen bekannt [90]. Für beide Sonden liegen keine Wiederholungen auf der humanen mtDNA vor und beide befinden sich auf dem L-Strang.

Beide Sonden sind bezüglich ihrer Hybridisierungseigenschaften für geeignet befunden wurden [82]. Der G/C-Gehalt der Sonde Hummit 1 ist 40,9% und der von Hummit 2 38,1%.

3.3 Hybridisierungsbedingungen

Zur Bestimmung des Richtwertes bezüglich der Hybridisierungs- und Waschttemperaturen wurden vorab zwei Methoden verwendet.

Bei der 2+4 - Methode [28] werden für jedes G oder C 4°C und für jedes A oder T 2°C dazuaddiert und von der Summe 10°C subtrahiert. Der errechnete Wert stellt dann die Hybridisierungstemperatur dar. Die Temperatur für die Waschschrte kann mit dieser Methode nicht berechnet werden.

Formel 1: Für DNA-DNA-Hybride wird folgende Formel zu Berechnung der Hybridisierungs- und Waschttemperaturen empfohlen [59]:

$$T = 81,5 + 16,6 (\log (C(Na))) + 0,41(G + C) - 500/N$$

mit

T = Hybridisierungstemperatur

N = Länge des Oligos

C(Na) = Konzentration der Natrium-Ionen in der am nterigsten konzentrierten
Waschlösung

C = Anzahl der Cytosine

G = Anzahl der Guanine

Bei Sonden länger als 100 bp fällt der Term 500/N weg.

Die Berechnungen ergaben für die Sonden folgende Werte:

Sonde Hummit 1

2+4 - Methode : Hybridisierungstemperatur = 52°C

Formel 1 : Hybridisierungstemperatur = 52,7°C

Sonde Hummit 2

2+4 - Methode : Hybridisierungstemperatur = 48°C

Formel 1 : Hybridisierungstemperatur = 45,3°C

3.4 Auswahl des Detektionssystems

Es gibt zwei gängige nicht-radioaktive Markierungsmethoden, zum einen mit Biotin und zum anderen mit Digoxigenin (Dig). Es wurde sich für die Dig-Markierung entschieden. Die Markierung erfolgte zwecks höherer Sensitivität am 3'- und am 5'-Ende.

Die Wahl des Substrats erfolgte nach den Kriterien der größt möglichen Sensitivität und der Benutzerfreundlichkeit. Es kamen zwei Substrate infrage, einerseits „CDP-Star“, das die höchste Sensitivität versprach, aber unter Umständen schwer zu handhaben ist, und andererseits „CSPD“, welches zwar eine einfache Handhabung erlaubt, dafür aber deutlich weniger sensitiv ist. Da vorab nicht zu entscheiden war, welches Substrat geeigneter ist, wurden beide getestet.

3.5 Phenol-Chloroformextraktion

Phenol und Chloroform führen zu einer Denaturierung von Proteinen, die sich in der Interphase ansammeln. Isoamylalkohol verhindert das Schäumen und das Ausbilden einer intensiven Interphase.

Bei einem pH über 7,0 finden sich alle Nukleinsäuren bei der Extraktion mit TE-gepuffertem Phenol in der wässrigen Phase. Unter pH 7,0 wird jedoch auch DNA denaturiert und in der Interphase angesammelt. Bei einem pH von 4,5 ist dieser Effekt maximal. Dies macht man sich bei der Präparation von RNA zu Nutze.

Die Extraktion wird mit 100 mg Gewebe durchgeführt. Das Probenmaterial wird zerkleinert und es werden 430 µl Nucleolysepuffer sowie 50 µl 10% SDS und 20 µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz durchmischt.

Über Nacht wird dieser Ansatz im 55°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wird visuell kontrolliert, ob die gesamte Probe verdaut ist. Ist dies nicht der Fall, wird nochmals Proteinase K zugegeben und weitere zwei Stunden inkubiert.

Sobald die Probe vollständig verdaut ist, werden 500 µl Phenol in die Probe gegeben und der Ansatz 10 Minuten stark gerüttelt. Danach wird das Eppendorf-Cup mit der Probe 10 Minuten bei 4000-5000 rpm zentrifugiert. Dabei wird der Ansatz in zwei Phasen getrennt, wovon die obere wässrige Phase (DNA-haltig) in ein neues Cup pipettiert und die untere Phase und die Interphase verworfen werden.

In die noch verbliebene Probe werden 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, durchmischt, dann erneut bei 4000-5000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase abpipettiert. Danach werden 500 µl Chloroform zugegeben und die Prozedur wird wiederholt.

Nachdem erneut der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert wurde, wird die 2- bis 2,5-fache Menge des Überstandes Ethanol (96%, -20°C) und 40 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben. Dieser Ansatz wird über Nacht bei -20°C gelagert und am nächsten Tag 20 Minuten bei 13000 rpm in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde 500 µl Ethanol (70%) dazugegeben. Danach wird die Probe erneut bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend dekantiert.

Im Anschluss werden die Proben bei Raumtemperatur im Eppendorf-Cup getrocknet. Nachdem der gesamte Alkohol verdunstet ist, wird das DNA-Pellet in sterilem Aqua dest. gelöst.

3.6 DNA Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem SQG1-Kit (Immucor, Roedermark, Deutschland) nach Firmenprotokoll für Proben aus Herz, Skelettmuskel und Gehirn oder mit der Phenol-Chloroformextraktion aus Fingernägeln, Haaren, Sperma und Spurenmaterial.

3.7 mtDNA-Standard

Zur Herstellung des mtDNA-Standards wurde das Kit „Expand Long Template PCR System“ (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Der Mastermix wurde nicht nach dem Firmen-Protokoll angesetzt, da dieser für die hier entwickelte PCR nicht geeignet war. Der Mastermix wurde stattdessen wie folgt angesetzt:

Mastermix 1:

dNTPs: 2,5 µl (10mM)

L-Mito-F: 1 µl (10pmol/ µl)

L-Mito R: 1 µl (10pmol/ µl)

Template: 500 ng humane Gesamt-DNA

Wasser ad 25 µl

Mastermix 2:

10xPuffer (2): 5 µl

Enzym-Mix: 0,6 µl

Wasser ad 25 µl

Im Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400) wurde folgendes Programm verwendet:

1. Einmal 2 min. bei 94°C
2. 35 Mal : 10 sec. bei 94°C und dann 10 sec. bei 68°C
3. beliebig lange bei 4°C

Als Primer wurden folgende Sequenzen aus der mtDNA verwendet:

L-Mito-F: 5'-GTG AGG CCA AAT ATC ATT CTG AGG GGC-3'

L-Mito-R: 5'-TTT CAT CAT GCG GAG ATG TTG GAT GG-3'

Die verwendete Template-DNA stammte aus Vollblut und wurde mit dem Kit „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden Deutschland) nach Firmenprotokoll isoliert.

Nach der PCR wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des 16,2 kb Fragments mittels des „Easy Pure DNA Purification Kits“ (Biozym, Hess.-Oldendorf, Deutschland) nach Firmenprotokoll. Der so hergestellte und aufgereinigte mtDNA-Standard wurde dann im Fluorometer mit dem „PicoGreen dsDNA QuantificationKit“ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) quantifiziert.

Nach der fluorometrischen Messung wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, diese beginnt mit 2 ng. In jedem Verdünnungsschritt wurde die Menge halbiert, sodass am Ende als minimale Standardmenge ca. 15,0 pg vorlag. Das aufgereinigte Produkt wurde zur Überprüfung, ob es sich um ein mtDNA-Fragment handelt, mit einer Restriktionsendonuklease (*PvuII*) verdaut und erneut mittels Agrosegelelektrophorese aufgetrennt, anschließend wurde ein Southern Blot durchgeführt. Damit die Fragmentgröße bestimmt werden konnte, wurde ein Dig-markierter DNA-Längenstandard mit im Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit Hummit 1 und Hummit 2 und zeigte die erwarteten Banden. Die beschriebenen Methoden waren im Labor etabliert.

3.8 Agarosegelelektrophorese und Southern Blot

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Um die Größe abschätzen zu können, lässt man DNA-Fragmente bekannter Länge im Gel mitlaufen.

Das Gel besteht aus 0,8% Agarose (Ultra Pure Agarose, Firma Gibco BRL, Gaithersburg, USA) in 1xTBE-Puffer. Der 1xTBE-Puffer wird aus 10xTBE-Puffer (216 g Tris, 110 g Borsäure und 80 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 2 Liter Aqua dest.) angefertigt. Die Elektrophorese wurde konstant bei 80 Volt durchgeführt. Anschliessend wurde das Agarosegel auf einen Schwamm und 3 Lagen Whatman Papier gelegt. Der Schwamm und das Papier wurden vorab in 10 x SSC getränkt und dann in eine Wanne mit 10 x SSC gestellt. Auf das Whatman Papier wurde das Agarosegel und darauf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim, Deutschland) gelegt, die vorher in 10 x SSC getränkt wurde. Auf die Nylonmembran wurden 6 Schichten Whatman Papier, darüber eine ca. 2 cm dicke Schicht Zellstoff gelegt, mit einer ca. 400 g schweren Glasplatte beschwert und für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der jeweiligen Sonde hybridisiert.

3.9 Restriktionsspaltung des PCR-Produktes

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann man DNA-Stränge in unterschiedlich große Fragmente spalten. Schneidet man den Ring der humanen mtDNA einmal, erhält man einen linearisierten DNA- Strang von ca. 16,5 kb Länge.

Für die Linearisierung der humanen mtDNA wurden 1-3 µl PCR-Produkt (gereinigt) verwendet, dies entspricht ca. 5-10 ng. Des Weiteren wurde 1/10 Volumenanteil 10 x Puffer (im Pvu II Kit enthalten) und 20 U Enzym (Pvu II) hinzugegeben.

Näheres zum Versuchsprotokoll ist den jeweiligen Firmenproduktinformationen zu entnehmen. Nach der qualitativen DNA-Analyse kann mittels der photometrischen Messung eine Quantifizierung erfolgen.

3.10 Photometrische Quantifizierung

Die Messung wird mit einem Spektralphotometer durchgeführt. Zur Ermittlung der Gesamt-DNA-Konzentration wird die Extinktion der Probe bei 260 nm gemessen, die Angabe erfolgt in $\mu\text{g/ml}$, wobei eine Extinktion von 1 ca. 50 $\mu\text{g DNA /ml}$ entspricht.

Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und bei 280 nm liefert Informationen über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung. Ein Quotient kleiner 1,8 deutet auf Verunreinigung der Lösung mit Proteinen und/oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) hin. Ist der Quotient jedoch größer 2,0 deutet dies auf eine mögliche RNA-Kontamination hin. Proteinverunreinigungen können sich negativ auf anschließende Amplifikationen auswirken. Die sichere Nachweisgrenze liegt bei 10 $\mu\text{g/ml}$.

Es wird in einer Quarzküvette gegen eine Leerprobe (Aqua bidest.) gemessen. Die Proben werden folgendermaßen angesetzt: die DNA-Probe wurde 1:10 mit Aqua bidest verdünnt. Jetzt werden die Verdünnungen gut geschüttelt und dann in die Küvette, mit der zuvor der Leerwert ermittelt wurde, gegeben. Die Küvette wird in den Strahlengang des Photometers gestellt und es erfolgt die Messung. Das Photometer zeigt dann einen Wert an, der, bei entsprechender Programmierung des Photometers, bereits der DNA-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Zwischen den einzelnen Probenmessungen muss die Küvette gut ausgespült werden.

3.11 Fluorometrische Quantifizierung

Die fluorometrische DNA-Quantifizierung wurde mit dem „PicoGreen dsDNA Quantification Kit“ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) nach Firmenprotokoll im Versa Fluor Fluorometer (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt.

3.12 Der Slot Blot

Der Slot Blot ist eine Methode zum Auftragen denaturierter DNA auf eine Membran. Die Membran wird in einen Apparat gelegt, dessen Teil unterhalb der Membran einen Unterdruck erzeugt, während der Teil über der Membran Probenschlitze (Slots) enthält. Füllt man DNA-Lösung in die Slots, wird die Flüssigkeit durch den Unterdruck auf der anderen Seite abgesaugt und die DNA auf der Membran immobilisiert, da die Membran für DNA-Moleküle undurchlässig ist. Für den Slot Blot ist die Flüssigkeitsmenge der Probe von geringer Bedeutung, da die gesamte Probe über eine konstante Membranfläche abgesaugt wird. Beim Dot Blot hingegen vergrößert sich die Membranfläche, auf der sich die Lösung verteilt, proportional zur Flüssigkeitsmenge.

3.13 Quantifizierung der Kern-DNA

Die Kern-DNA wurde mit der mit Dig-markierten Sonde D17Z1 (eine primatenspezifische Kern-DNA-Sonde) im Slot Blot quantifiziert. Als Quantifizierungsstandard wurde eine Verdünnungsreihe von 10- bis 80 ng der K562 Standard DNA (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) verwendet. Die Proben sowie die Standardverdünnungsreihe wurden wie oben beschrieben auf der Membran immobilisiert. Die Membran wurde dann 20 Minuten in 5 x SSC, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS und 1% Blockierungslösung prähybridisiert, danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation in Hybridisierungspuffer (Prähybridisierungspuffer + 0,67 nM der Dig-markierten Sonde D17Z1) bei 45°C. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 Minuten bei 50°C in 2 x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Dig-Antikörper (Roche Mannheim, Deutschland). Die Filmexpositionszeit betrug 5 Minuten.

3.14 Dot Blot

Der Dot Blot wurde als alternative Blotmethode zum Slot Blot getestet. Im Gegensatz zum Slot Blot wird hier die DNA nur mittels einer Pipette auf die Membran aufgetropft und anschließend durch Hitze immobilisiert. Im Gegensatz zum Slot Blot können nur kleine Flüssigkeitsmengen aufgetragen werden, dementsprechend müssen die Probenlösungen sehr konzentriert sein, um genügend große DNA-Mengen auftragen zu können. Im Folgenden werden verschiedene Denaturierungsverfahren bezüglich ihrer Tauglichkeit für den Dot Blot beschrieben.

3.14.1 Denaturierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Proben-DNA zu denaturieren. Im Wesentlichen gibt es die Hitze- und Salzdenaturierung, die entweder miteinander und/oder mit einer Ultraschallbehandlung kombiniert werden können.

Hitzenaturierung (HD)

Es werden ca. 6 µl Probe in das Eppendorf Cup pipettiert. Damit keine Flüssigkeit verdunstet, müssen die Cups mit Parafilm umwickelt werden. Zuerst werden die Proben für 10 Minuten auf 95- bis 100°C erhitzt. Danach müssen die Proben sofort einige Sekunden in einer Zentrifuge, die vorher auf 7°C gekühlt wurde, anzentrifugiert werden. Nach dem Zentrifugieren erfolgt die Kühlung der Proben für 3 Minuten auf Eis. Danach sollte zügig mit dem Auftragen der Proben in 1,5 µl Schritten begonnen werden, d.h. es werden 1,5 µl von jeder Probe aufgetragen und die Membran wird anschließend bei Raumtemperatur oder mit dem Fön getrocknet. Nachdem die Membran getrocknet wurde, können erneut 1,5 µl Probe aufgetragen und die Membran wiederum getrocknet werden. Das Probenauftragen kann beliebig oft wiederholt werden. Ist die gewünschte Probenmenge aufgetragen, wird die Membran eine Stunde bei 90°C gebacken, dann wird nach dem Standardprotokoll verfahren.

Salzdenaturierung (SD)

Bei dieser Denaturierung werden 3 µl Probe in das Eppendorf Cup pipettiert. Zu der Probe wird (im Verhältnis 1 µl Denaturierungslösung auf 1 µl Probe) die Denaturierungslösung gegeben. Dieser Ansatz wird gut geschüttelt und 10 Minuten inkubiert. Die Proben werden dann wie bei der Hitzedenaturierung in 1,5 µl Schritten pipettiert. Nachdem die komplette Probe (z.B. 6 µl) aufgebracht und die Membran getrocknet wurde, wird diese für 5 Minuten in Neutralisierungslösung inkubiert und anschließend nach dem Standardprotokoll verfahren.

Salzdenaturierung nach dem Blotten

Hier wird die DNA auf die Membran geblottet und bei 37°C getrocknet, danach wird die Membran 10 Minuten in Denaturierungslösung inkubiert. Nach der Denaturierung erfolgt eine fünfminütige Neutralisierung. Alle weiteren Schritte erfolgen nach Standardprotokoll.

Ultraschallvorbehandlung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten DNA durch Ultraschallwellen zu denaturieren, bevor die Proben einem der anderen Denaturierungsverfahren unterzogen werden. Im Folgenden werden die Varianten aufgelistet, die verwendet wurden:

US 1: 20 Strokes (1-2 sec. lang) mit 5 sec. Pause zwischen den Strokes

US 2: 15 Strokes (1-2 sec. lang) mit 5 sec Pause zwischen den Strokes

US 3: 10 Strokes (1-2 sec. lang) mit 5 sec. Pause zwischen den Strokes

Bei US 1-3 wurde ein Gerät mit 760 W verwendet.

3.14.2 DNA-Denaturierungen für den Dot Blot

Es wurden die verschiedenen Salzdenaturierungen getestet, z.T. wurden sie mit einer Ultraschallvorbehandlung (unter 3.14.1 beschriebenen) kombiniert. Die Salzdenaturierungen wurden außerdem mit einer Hitzedenaturierung verglichen.

3.15 Optimierung der Sensitivitätsgrenze der Sonden Hummit 1 und 2 durch Modifikation der Detektion

Im Rahmen von Vorversuchen wurde getestet, welche Membran, Sondenkonzentration, Digoxigenin-Antikörperkonzentration und Filmexpositionszeit für die Sonden Hummit 1 und Hummit 2 optimal sind. Als Membranen wurden die Hybond N (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) und die positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim, Deutschland) verglichen. Die Sondenkonzentration wurde in einem Bereich zwischen 1,4 pmol/ml und 10 pmol/ml und die Konzentration des mit Alkalischer Phosphatase markierten Digoxigenin-Antikörpers (Roche, Mannheim, Deutschland) zwischen Verdünnungen von 1:10.000 bis 1:50.000 untersucht. Die optimale Filmexpositionszeit wurde für das jeweilige Substrat zur Alkalischen Phosphatase (CDP-Star(Roche, Mannheim, Deutschland) oder CSPD (Roche, Mannheim, Deutschland)) und den jeweiligen Film (BioMax Light (Kodak, Stuttgart, Deutschland) sowie Min-R 2000 (Kodak, Stuttgart, Deutschland)) ermittelt.

3.16 Hybridisierungsbedingungen von Hummit 1 und 2

3.16.1 Sensitivitätserhöhung

Die optimalen Bedingungen bezüglich der Sensitivität, d.h. möglichst niedrige Nachweisgrenze bei möglichst geringem Hintergrund, wurden zwischen folgenden Bedingungen ermittelt: Als obere stringente Grenze wurde eine Hybridisierungstemperatur von 55°C und ein anschließendes zweimal 15minütiges Waschen in 2 x SSC+0,1% SDS bei Raumtemperatur sowie ein zweimal fünfminütiger Waschgang in 0,5 x SSC+0,1% SDS bei 55°C gewählt. Bei der unteren stringenten Grenze betrug die Hybridisierungstemperatur 49°C und es wurde einmal 15 Minuten in 6 SSC + 0,1% SDS sowie einmal 5 Minuten in 2 x SSC+0,1% SDS gewaschen. Beide Waschgänge wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

In den restlichen Protokollpunkten wurde nach Standardprotokoll verfahren (siehe auch Kapitel „Standardprotokoll für den Slot Blot der mtDNA“).

Die Membranen enthielten Verdünnungsreihen humaner Gesamt-DNA und wurden bis zu 4 x rehybridisiert. Als Film wurde der Min-R2000 (Kodak, Stuttgart, Deutschland) verwendet.

3.16.2 Humanspezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2

Um die humanspezifischen Hybridisierungsbedingungen für Hummit 1 zu ermitteln, wurde zwischen folgenden Bedingungen schrittweise nach den optimalen Bedingungen gesucht: Eine Hybridisierungstemperatur von 61°C und ein zweimal 15minütiges Waschen in 2 x SSC + 0,1% SDS bei 61°C waren die stringentesten Bedingungen, die verwendet wurden.

Für die Sonde Hummit 2 wurde die Membran nach der Hybridisierung zweimal fünf Minuten in 2 x SSC + 0,1% SDS und zweimal 15 Minuten in 0,5 x SSC + 0,1% SDS bei Temperaturen zwischen 48°C und 52°C gewaschen. Die Hybridisierungstemperatur variierte zwischen 40°C und 52°C. Hierbei wurde berücksichtigt, dass die Nachweisgrenze in einem akzeptablen Bereich bleibt, da diese Methode zur Spurenuntersuchung verwendet werden sollte.

Als Tiere, gegen die eine Abgrenzung möglich sein musste, sind folgende zu nennen: *Pan paniscus*, *Pan troglodytes* (zwei Schimpansenarten), *Gorilla gorilla gorilla*, Schaf, Schwein, Ratte, Maus, Kaninchen, Schwarzwild, Rind, Katze, Meerschweinchen, Reh, Ziege, Fuchs, Taube, Pferd, Frosch und Hund.

Diese Spezifitätsversuche sollten außerdem klären, ob die Sonde unspezifisch an Kern-DNA bindet. Hierfür wurde auf eine Membran aus menschlichem Blut und Sperma extrahierte DNA geblottet und die Membran dem Standardprotokoll mit den jeweils zu testenden Waschbedingungen unterzogen. Erwartungsgemäß sollten die Signale bei der DNA aus Sperma viel geringer sein, da der mtDNA-Gehalt hier nur ca. 0,2% beträgt, im Vergleich dazu liegt er im Blut bei ca.1,9% [84].

3.16.3 Bedingungen, unter denen die Spezifitätsversuche von Hummit 1 und Hummit 2 ermittelt wurden

Die Membranen, mit denen die Versuche durchgeführt wurden, enthielten eine Verdünnungsreihe des mtDNA-Standards und/oder eine Verdünnungsreihe humaner Gesamt-DNA (aus der Zelllinie K562) sowie Proben verschiedener Tiere inklusive Primaten.

Es wurden mindestens 50 ng tierische Gesamt-DNA pro Probe aufgetragen, die Konzentrationen wurden vorher entweder photometrisch oder fluorometrisch ermittelt. Alle restlichen Versuchsbedingungen entsprechen dem Standardprotokoll (siehe auch Kapitel 3.19 „Standardprotokoll für den Slot Blot der mtDNA“).

Die Membranen wurden mehrfach rehybridisiert, sodass die Ergebnisse besser vergleichbar waren. Es fanden maximal 4 Rehybridisierungen statt. Bis zur 4. Rehybridisierung konnte kein signifikanter Signalabfall festgestellt werden.

3.17 Steigerung der Humanspezifität der Sonde Hummit 2

Es wurden tierische und humane Proben mit BST 98/ (Promega, Mannheim, Deutschland) verdaut. Dieses Enzym schneidet die humane mtDNA im komplementären Bereich der Sonde Hummit 2. Die Proben wurden anschließend auf eine Membran aufgetragen. Neben die verdauten Proben wurden die entsprechenden, unverdauten Proben in gleicher Menge aufgetragen.

3.18 MtDNA-Spezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2

Es wurden humane Proben im Slot Blot aufgetragen und anschließend mit einer der beiden Sonden Hummit 1 oder Hummit 2 hybridisiert. Danach wurde die Membran gestrippt und mit der jeweils anderen Sonde hybridisiert.

Um die mtDNA-Spezifität von Hummit 1 und Hummit 2 experimentell zu verifizieren, wurde die Gesamt-DNA aus humanen Vollblut und Sperma extrahiert und jeweils 3 Proben mit jeweils 100 ng auf eine Membran mittels Slot Blot aufgetragen. Anschließend wurde diese Membran mit Hummit 1 oder Hummit 2 nach dem jeweiligen Standardprotokoll (Kapitel 3.19) hybridisiert.

Da die Gesamt-DNA aus humanem Sperma ca. 0,2% mtDNA und die Gesamt-DNA aus humanen Vollblut ca. 1,9% mtDNA enthält, ist bei einer mtDNA-Spezifität der Sonden ein signifikanter Signalunterschied zwischen Vollblut und Sperma zu erwarten.

In einem weiteren Experiment wurden 1-2 Mikrogramm humane Gesamt-DNA mit dem Restriktionsenzym *PvuII* verdaut. Der Verdau linearisiert die mtDNA und schneidet sie in zwei Fragmente. An jedes der Fragmente bindet jeweils eine der beiden Sonden. Dementsprechend sollten im Southern Blot zwei Banden sichtbar sein. Bei mehr als zwei Banden muß erwogen werden, dass die Sonden unspezifisch an die humane Kern-DNA binden.

3.19 Standardprotokoll für den Slotblot der mtDNA

Protokoll für Hummit 1:

Im Folgenden wird das Standardprotokoll für die Sonde Hummit 1 beschrieben: Die Hybridisierung der Sonden wurde im Hybridisierungssofen (400 HY-E, Bachhofer, Reutlingen Deutschland durchgeführt.

Prinzipiell gilt für das gesamte Versuchsprotokoll, dass alle Lösungen in die Hybriboats (rechteckige Schalen für die Waschschrte) vorgelegt werden sollten, um die Luftexpositionszeiten auf ein Minimum zu reduzieren. Bevor man mit dem Versuch beginnt, muss man das Wasserbad auf 58°C und den Ofen auf 90°C vorheizen sowie die Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung auftauen bzw. ansetzen.

Danach wird die Membran mit desinfizierten Instrumentarien zugeschnitten (8x11,5 cm). Das Slotblot-Gerät wird entsprechend der Firmenanleitung aufgebaut.

10 µl der Proben wurden gründlich gevortext. Dann wurden in jede Probe 100 µl Denaturierungslösung pipettiert. Dieser Ansatz wird 10 Minuten inkubiert, parallel dazu wird die Membran 5 Minuten in 2 x SSC geschwenkt. Nach dem Schwenken in 2 x SSC wird die Membran mittels einer Pinzette auf das SlotBlot-Gerät gelegt, dieses wird jetzt komplett zusammengebaut (siehe Firmenanleitung).

Nachdem das Gerät Unterdruck aufgebaut hat, werden die Proben aufgetragen. Dann werden diese abgesaugt. Anschließend wird jeder Probenschlitz (Slot) mit 400 µl Denaturierungslösung gespült. Sobald die Denaturierungslösung aus allen Slots abgesaugt wird, wird die Membran vorsichtig vom Slot Blot-Gerät genommen, dabei sollte die Membran nicht seitlich abgezogen werden, da die nicht fixierte DNA auf der Membran verschmiert werden könnte. Die Membran wird nun ins Hybriboat gelegt und 5 Minuten in ca. 25 ml Neutralisierungslösung inkubiert. Dabei sollte die DNA-Seite oben liegen und die Membran nicht geschüttelt werden.

Nach der Neutralisation wird die Membran zwischen Whatman-Papier gelegt und 60 Minuten im Ofen bei 90°C gebacken (DNA-Seite beim Auflegen auf das Papier nach oben). Nach dem Backen wird die Membran 3 x 5 Minuten in Aqua dest. unter starkem Rütteln gewaschen und anschließend in die Hybridisierungsröhre mit der DNA-Seite zum Lumen gelegt und eine Stunde unter Drehen bei 58°C prähybridisiert. Dabei sollte die Membran mindestens einmal pro Umdrehung vollständig mit Prähybridisierungslösung bedeckt sein.

Nach einer Stunde wird die Lösung verworfen und die Hybridisierungslösung zugegeben, auch hier muss die Membran einmal pro Umdrehung vollständig bedeckt sein (Hybridisierungspuffermenge sollte ca. 1/3 der Prähybridisierungspuffermenge betragen). Die Hybridisierung bei 58°C sollte mindestens zwei Stunden betragen, kann aber auch über Nacht erfolgen.

Bevor der nächste Versuchsteil begonnen wird, muss das Blockierungsreagenz aufgetaut werden, um die entsprechenden Lösungen zügig ansetzen zu können.

Die Membran wird nach der Hybridisierung 2 x 15 Minuten in jeweils 50 ml Waschlösung 1 bei 58°C im Hybridisierungssofen unter ständigem Drehen gewaschen. Danach erfolgt eine einminütige Inkubation mit 50 ml Waschlösung 3 bei Raumtemperatur unter Schütteln.

Die Membran wird jetzt eine Stunde in 50 ml einmal konzentrierter Blockierungslösung unter leichtem Schütteln im Hybriboat inkubiert. Anschließend wird die Blockierungslösung verworfen und es werden 25 ml Antikörperlösung zugegeben. In dieser Lösung wird die Membran ca. 30 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgt ein 4 x 10minütiges Waschen in jeweils 50 ml Waschlösung 3, dabei wird das Hybriboat stark geschüttelt. Zuletzt wird die Membran 5 Minuten in einmal konzentriertem Detektionspuffer (Waschlösung 4) wieder unter starkem Schütteln gewaschen.

Während des letzten Waschschrtes wird die Folie zurechtgeschnitten, die Membran anschließend hineingelegt und mit CDP-Star besprüht. Anschließend erfolgt eine fünfminütige Dunkelinkubation.

Nach dieser Inkubation wird die Membran in der Folie belassen und die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig ausgestrichen und die Membran blasenfrei einschweißt. Das Ausstreichen des Substrats aus der Folie sollte so gleichmäßig wie möglich erfolgen.

Die eingeschweißte Membran wird bei 36°C für 10 Minuten vorinkubiert und anschließend auf den Film in der Filmkassette gelegt. Die Inkubation in der Dunkelkammer erfolgt je nach Film und Substrat Minuten bis Stunden. Nach der Belichtung wird der Film entwickelt.

Protokoll für Hummit 2: Die Hybridisierungstemperatur für Hummit 2 beträgt 41°C, außerdem werden nach der Hybridisierung andere Waschbedingungen (siehe unten) verwendet und dem Hybridisierungspuffer 5 pmol Hummit 2 statt Hummit 1 pro Milliliter zugesetzt. Es wird 2 x 5 Minuten statt 2 x 15 Minuten in Waschlösung 1 bei lediglich 50°C gewaschen. Zusätzlich erfolgt nach diesem Waschschrte ein weiterer, bei dem die Membran 2 x 15 Minuten in Waschlösung 2 bei 50°C gewaschen wird. Das restliche Protokoll entspricht dem von Hummit 1.

3.20 MtDNA-Quantifizierung

Jeweils 500 mg Herzmuskel, Kleinhirn, Nucleus caudatus, Frontalhirn und Skelettmuskel wurden von 50 Personen, die altersentsprechend gesund waren und eine Altersspanne von ca. 93 Jahren (jüngste Person: 2 Monate, älteste Person: 93 Jahre) abdeckten, innerhalb von maximal 48 h nach Todeseintritt genommen. Der Tod trat akut oder perakut ein, Ursachen waren z.B. Unfall oder Intoxikationen. Das Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur DNA-Isolierung bei -20 Grad Celsius gelagert. Die DNA wurde mittels des Qiagen DNA Extraktion Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Firmenprotokoll extrahiert. Die Slot Blot-Quantifizierung der mtDNA wurde mit dem für die Sonde Hummit 1 entwickelten Standardprotokoll durchgeführt. Die Kern-DNA-Menge wurde mit dem Slot Blot-Protokoll für die Sonde D17Z1 bestimmt.

3.21 Verhältnis von mtDNA zu Kern-DNA und Berechnung der mtDNA-Kopienzahl

Jede Membran wurde zuerst mit der Sonde Hummit 1 und Hummit 2 (nach Protokoll von Hummit 1) hybridisiert und die mtDNA-Menge für die einzelnen Proben bestimmt. Danach wurde die Membran gestrippt und mit der Sonde D17Z1 rehybridisiert und die Kern-DNA-Mengen der einzelnen Proben bestimmt.

Die Quantifizierung der Proben erfolgte mit einer Geldokumentationsanlage (Herolab, Heidelberg, Deutschland). Die Menge der mtDNA wurde als prozentualer Anteil der mtDNA-Masse an der Kern-DNA-Masse angegeben, d.h. bei 100 pg mtDNA und 10 ng Kern-DNA ergibt sich eine mtDNA-Menge von 1%. Die mtDNA-Kopienzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{MtDNA Kopienzahl} = m_n P_m C / 100 m_m$$

berechnet, wobei

m_n = Masse pro diploider humaner Kern-DNA = $2 M_D b p_n = 7; 4525 \text{ pg}$

P_m = mtDNA-Prozentsatz der Kern-DNA-Masse

C = Korrekturfaktor = 1,0228

M_D = Molmasse der DNA = $660 \text{ g/mol} = 1,096 \times 10^{-21} \text{ g/Basenpaar}$

$b p_n$ = Zahl der Basenpaare pro humaner haploider Kern-DNA = $3,4 \times 10^9$

1 mol DNA = $6; 0221 \times 10^{23}$ Basenpaare

m_m = Masse pro humaner mtDNA

Masse pro humaner mtDNA = $M_D \times b p_m = 18,159 \times 10^{-6} \text{ pg}$

$b p_m$ = Anzahl der Basenpaare der humanen mtDNA = 16569

3.22 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurde der Kruskis-Wallis-Test mit dem SPSS statistical package 12.0.1 (München, Deutschland) sowie die nichtparametrischen Pearson Korrelation verwendet. Die statistische Beratung erfolgte durch PD Dr. Friedrich, Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, Universität zu Lübeck.

3.23 Material und Geräte

In diesem Kapitel werden die humanen Proben und die verwendete Slot Blot-Apparatur noch einmal genau beschrieben. Alle Materialien und Geräte werden im Anhang A aufgelistet.

3.24 Humane und Tierische Proben

Die verwendete humane DNA wurde aus Skelettmuskel (M. iliopsoas), verschiedenen Hirnarealen, Blut und Herzmuskel extrahiert. Des Weiteren wurde DNA aus der humanen Zelllinie K562 sowie „Human Genomic DNA“ (Roche, Mannheim) verwendet.

Die Proben aus Hirnarealen, Skelett- und Herzmuskulatur stammten aus Obduktionen des Instituts für Rechtsmedizin der Universität zu Lübeck. Das für die Extraktion verwendete Blut stammte ebenfalls aus der Rechtsmedizin Lübeck (von freiwilligen Spendern). Die tierischen Proben stammen aus dem Tierstall der Universität zu Luebeck und aus dem Lübecker Schlachthof.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die humane mitochondrale DNA in verschiedenen humanen Geweben und Altersgruppen quantifiziert, um die Hypothese eines Anstiegs der mtDNA-Kopienzahl im Alter zu untersuchen [10, 11]. Die Quantifizierung wurde mit den Sonden Hummit 1 und 2 (siehe Kapitel 3.1 und 3.2) durchgeführt. Diese wurden im Folgenden bezüglich ihrer Eignung zur forensischen Spurenanalyse getestet.

4.1 DNA-Denaturierungen für den Dot Blot

Der Dot Blot und der Slot Blot wurden zur Ermittlung der sensitiveren Quantifizierungsmethode verglichen. Dazu wurden im Dot Blot verschiedene DNA-Denaturierungsverfahren untersucht, für den Slot Blot wurde die Salzdenaturierung (siehe Kapitel 3.19) verwendet. Im Slot Blot kann aus technischen Gründen keine andere Denaturierungsmethode effektiv angewendet werden.

Die Tabelle 4.1 zeigt eindeutig, dass im Dot Blot die Hitzedenaturierung der Probenflüssigkeit die am besten geeignete Methode ist. Die Signalintensität von 10 ng humaner Gesamt-DNA ist für die verschiedenen Denaturierungsverfahren in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Salzdenaturierung ist aufgrund positiver Negativkontrollen (H_2O) für den Dot Blot nicht verwendbar. Demzufolge kann nur die weniger sensitive Hitzedenaturierung verwendet werden. Im Vergleich zur Sensitivität des Slot Blots (siehe Kapitel 4.3.1) ist der Dot Blot signifikant unempfindlicher. Folglich wurde in dieser Arbeit der Slot Blot zur Quantifizierung der humanen mtDNA verwendet.

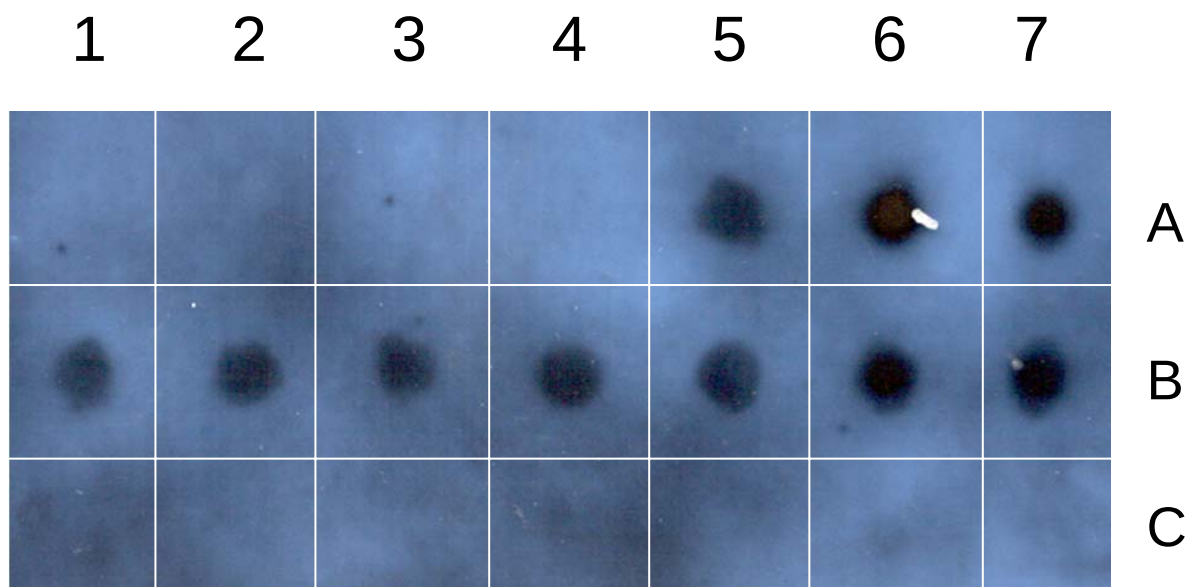


Abbildung 4.1: Vergleich verschiedener Denaturierungsmethoden für den Dot Blot. Das Schema der aufgetragenen Proben ist der Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Beschriftung Abbildung 4.1		1	2	3	4	5	6	7
	Denaturierungsart	Proben auf der Membran (humane Gesamt-DNA)						
A	SD					H ₂ O	10 ng	10 ng
B	SD+US3	H ₂ O	50 pg	100 pg	500 pg	1 ng	10 ng	10 ng
C	HD					H ₂ O	10 ng	10 ng

Tabelle 4.2: Probenschema der Abbildung 4.1

Denaturierungsart	Signalstärke von 10 ng Gesamt-DNA
SD	+++
SD + US1	+++
SD + US2	+++
SD + US3	+++
HD	+
SDB	-

Tabelle 4.1: Effektivität verschiedener Denaturierungsverfahren für den Dot Blot

Legende zu Tabelle 4.1 und 4.2:

SD = Salzdenaturierung

US1 = 20 Strokes (1-2 sec.) mit 5 sec. Pause zwischen den Strokes

US2 = 15 Strokes (1-2 sec.) mit 5 sec. Pause zwischen den Strokes

US3 = 10 Strokes (1-2 sec.) mit 5 sec. Pause zwischen den Strokes

HD = Hitzedenaturierung

SDB = Salzdenaturierung nach dem Blotten

+++ = starkes Signal

+ = schwaches Signal

- = kein Signal

4.2 Optimierung der Sensitivitätsgrenze der Sonden

Hummit 1 und 2 durch Modifikation der Detektion

Das Protokoll für die Detektion der humanen mtDNA mit den Sonden Hummit 1 und 2 wurde in den nachfolgenden Versuchen bezüglich einer Sensitivitätserhöhung modifiziert. Die Auswertung der Vorversuche (siehe Kapitel 3.15) ergab, dass die positiv geladene Nylonmembran von Roche, eine Sondenkonzentration von 5 pmol/ml und eine Verdünnung des Digoxigenin-Antikörpers von 1:30000 optimal sind. Für die Filmexpositionszeit muß das jeweilige Substrat sowie der jeweils verwendete Film berücksichtigt werden, dementsprechend unterscheiden sich auch die Expositionszeiten. Die jeweiligen optimalen Belichtungszeiten sind der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Film	Substrat	Belichtungsdauer
Min-R-2000	CSPD (1:100)	mindestens 8 Stunden- bis 3 Tage
Min-R-2000	CDP-Star (1:100)	45-90 Minuten
Bio Max Light	CDP-Star (1:100)	1-15 Minuten
Min-R-2000	CDP-Star (1:500)	mindestens 8 Stunden

Tabelle 4.3: Belichtungsdauern bei verschiedenen Filmen und Substraten

4.3 Hybridisierungsbedingungen von Hummit 1 und 2

Im Folgenden werden zuerst die geeigneten Hybridisierungsbedingungen für die höchste Sensitivität und anschließend für die höchste Spezifität der Sonden Hummit 1 und 2 vorgestellt.

4.3.1 Sensitivitätserhöhung

Zur Ermittlung der höchsten Sensitivität der Sonden Hummit 1 und 2 wurden verschiedene Versuchsbedingungen modifiziert (siehe Kapitel 3.16.1). Unter den in der Tabelle 4.4 angegebenen Bedingungen wurden für die jeweiligen Substrate die höchsten Sensitivitäten bei geringem Hintergrund erzielt.

Substrat	Waschbedingungen
CSPD	1 x 15 Minuten in 4 x SSC+0,1% SDS bei Raumtemperatur 1 x 15 Minuten in 2 x SSC+0,1% SDS bei Raumtemperatur
CDP-Star	2 x 10 Minuten in 4 x SSC+0,1% SDS bei Raumtemperatur

Tabelle 4.4: Die Tabelle zeigt die Waschbedingungen für die Sonden Hummit 1 und 2 um eine maximale Sensitivität bei der Quantifizierung der humanen mtDNA zu erreichen.

Die Sensitivität der Substrate CSPD und CDP-Star ist unterschiedlich (CDP-Star ist signifikant stärker lumineszent) und hängt von der Filminkubationszeit ab. So wurde die mit CSPD inkubierte Membran über Nacht auf dem Film MinR 2000 inkubiert,

während sich bei der mit CDP-Star behandelten eine Expositionszeit von ca. 45 Minuten als ausreichend erwies. Nach übernacht Belichtung erhält man deutliche Signal- und Hintergrundverstärkung, wenn man CDP-Star als Substrat verwendet; der Hintergrund bleibt aber homogen (siehe Abbildung 4.2).

Die Nachweisgrenzen für humane Gesamt-DNA differierten stark zwischen verschiedenen Individuen. Dies ist vermutlich auf einen unterschiedlichen mtDNA-Gehalt sowie auf die Problematik der exakten Vorquantifizierung, z.B. mit dem Photo- oder Fluorometer, zurückzuführen (siehe Kapitel 5.2). Im Allgemeinen liegen die Nachweisgrenzen für humane Gesamt-DNA abhängig vom Substrat (CSPD oder CDP-Star) und Film zwischen 5- bis 20 pg mtDNA-Standard. Diese sehr sensitive Methode kann leider nicht bedenkenlos verwendet werden, da es zu unspezifischen Bindungen bei Proben von verschiedenen Tieren kam.

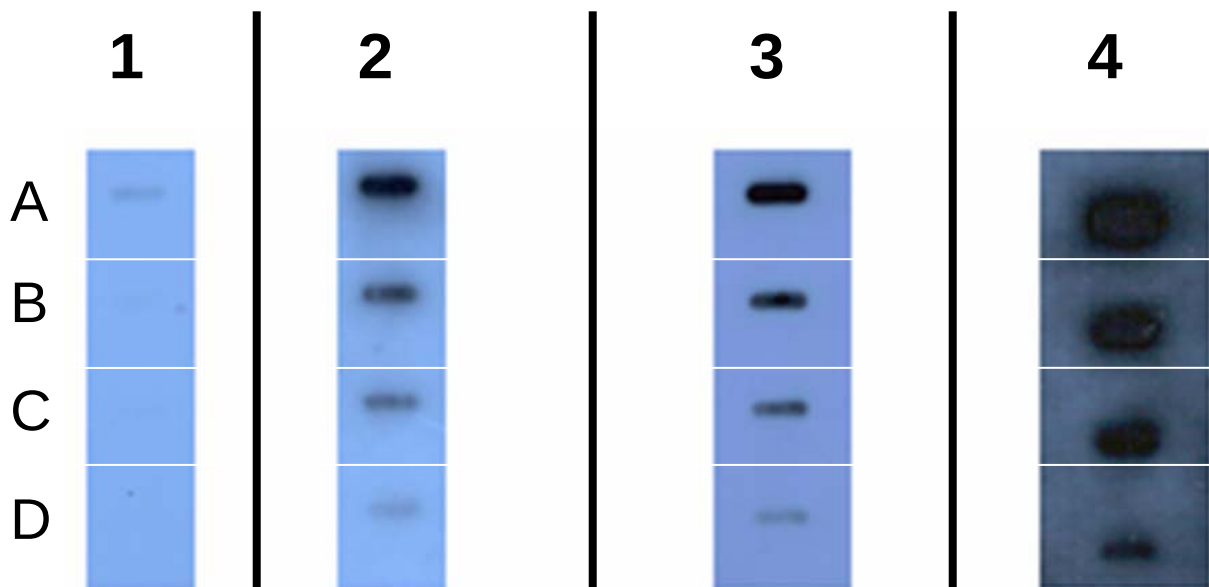


Abbildung 4.2: Die getesteten Membranstreifen zeigen identische Verdünnungsreihen (von oben nach unten: A: 5 ng, B: 1 ng, C: 0,5 ng, D: 0,25 ng humane Gesamt-DNA). Für die Membran in Film 1 und 2 wurde CSPD und für die Membran in Film 3 und 4 CDP-Star als Substrat verwendet. Die Filme 1 und 3 wurden 30 Minuten und die Filme 2 und 4 für 12 Stunden belichtet.

4.3.2 Humanspezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2

Für die forensische Spurenanalyse ist die Untersuchung der humanen mtDNA mit humanspezifischen Sonden von Interesse (siehe Kapitel 1.4). Hierzu wurde die Humanspezifität der Sonden Hummit 1 und 2 untersucht.

Die Versuche zur Humanspezifität (siehe Kapitel 3.16.2) von Hummit 1 ergaben, dass eine Hybridisierungstemperatur von 58°C und ein anschließendes zweimaliges Waschen für jeweils 15 Minuten in 2 x SSC+0,1% SDS bei 58°C die optimalen Bedingungen sind.

Es gab bei 500 ng Lambda-DNA, 10 ng DNA aus humanem Sperma und 300 ng Herings-DNA reproduzierbar kein Signal im Slot Blot, hingegen waren bei einigen Säugetieren (Kaninchen, Hund, Schaf, Schwein) immer noch schwache Signale vorhanden. Die aus humanem Blut extrahierte DNA ergab erwartungsgemäß deutliche Signale (Daten nicht gezeigt). Unter Bedingungen maximaler Stringenz (Hybridisierungstemperatur von 61°C und zweimal 15minütigen Waschen mit 2 x SSC+0,1% SDS bei 61°C) konnte z.T. eine spezifische Bindung von Hummit 1 an humane mtDNA erreicht werden, wobei dies nicht reproduzierbar war. Da die Sensitivität unter diesen Bedingungen sehr gering war, wurden stringendere Bedingungen nicht weiter untersucht.

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C und einem zweimal fünfminütigen Waschen in 2 x SSC+0,1% SDS und zweimal 15minütigen Waschen in 0,5 x SSC+0,1% SDS bei jeweils 50°C konnte mit der Sonde Hummit 2 humane mtDNA eindeutig von tierischer unterschieden werden (siehe Abbildung 4.3). Eine Humanspezifität der Sonde Hummit 2 ist unter den gewählten Bedingungen (siehe oben) gegeben, wenn gleiche DNA-Mengen von tierischer und humaner DNA eingesetzt werden. Sollte eine vorherige Quantifizierung der untersuchten Proben nicht möglich und damit die Humanspezifität von Hummit 2 nicht gesichert sein, wird die Verwendung des Restriktionsenzym *BST* 98I empfohlen (siehe Kapitel 4.3.3).

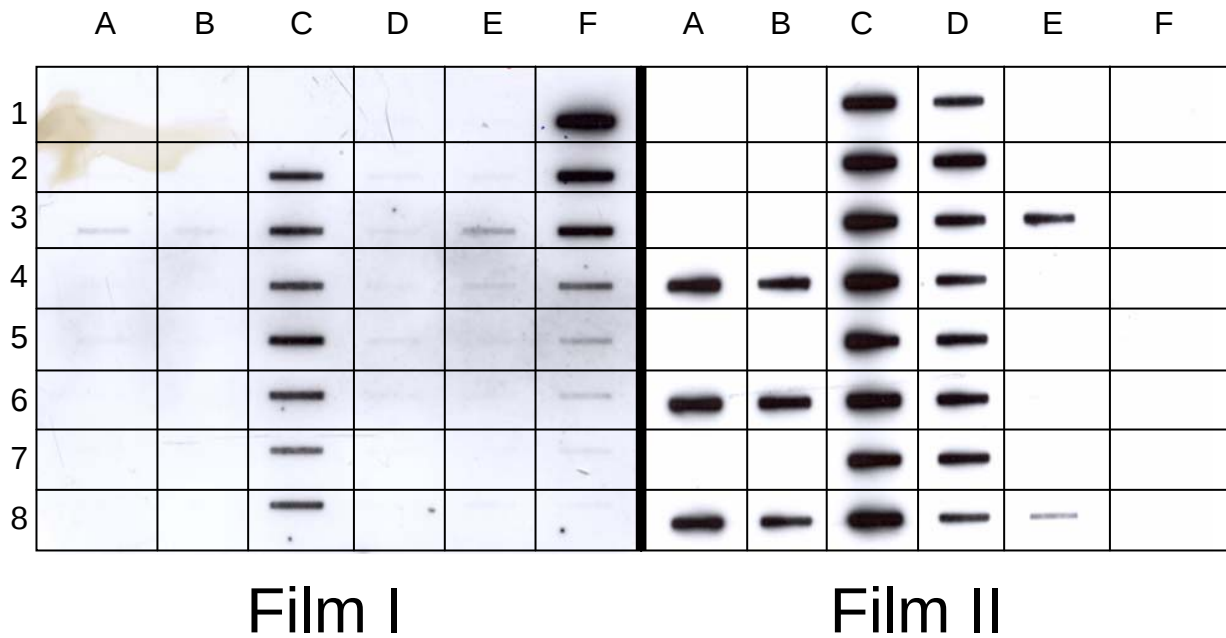


Abbildung 4.3: Die Filme I und II zeigen dieselbe Membran (Probenverteilung siehe Tabelle 4.5), für den Film I wurde die Membran einer Hybridisierung mit Hummit 2 unterzogen und für den Film II mit D17Z1.

	Verdau mit <i>BST</i> 98I			Verdau mit <i>BST</i> 98I	mtDNA- Standard	
	A	B	C	D	E	F
1	Katze	Katze	<i>Pan paniscus</i>	<i>Pan paniscus</i>	Leer	1,6 ng
2	Schwein	Schwein	Mensch	Mensch	Leer	0,8 ng
3	Schaf	Schaf	Mensch	Mensch	Mensch A	0,4 ng
4	Gorilla	Gorilla	Mensch	Mensch	Schaf A	0,2 ng
5	Ratte	Ratte	Mensch	Mensch	Mensch Ü	0,1 ng
6	Gorilla	Gorilla	Mensch	Mensch	Mensch Ü	50 pg
7	Primat	Primat	Mensch	Mensch	Schaf Ü	25 pg
8	Gorilla	Gorilla	Mensch	Mensch	Mensch Ü	12,5 pg

Tabelle 4.5: Die Tabelle zeigt die in Abbildung 4.3 aufgetragenen Proben.

A = Probe wurde dem *BST* 98I-Protokoll unterzogen, das Enzym wurde der Probe aber nicht zugegeben. Ü = abzentrifugierter Überstand aus dem *BST* 98I-Verdau (siehe Kapitel 3.17) (wurde zur Klärung der Effektivität der DNA-Abzentrifugation beim *BST* 98I-Verdau untersucht) . Bei allen Proben wurden 50 ng auf die Membran aufgetragen. In der Spalte „mtDNA-Standard“ wurde der mtDNA-Standard in der jeweils angegebenen Menge aufgetragen.

4.3.3 Steigerung der Humanspezifität der Sonde Hummit 2

Zur Erhöhung der Humanspezifität der Sonde Hummit 2 wurden die Proben mit dem Restriktionsenzym *BST* 98I verdaut. Dieses Enzym schneidet die zu Hummit 2 komplementäre Sequenz auf der humanen mtDNA und ermöglicht so den spezifischen Nachweis humaner mtDNA (siehe Kapitel 5.5). Die verdauten Proben wurden auf eine Membran mittels Slot Blot aufgetragen. Neben die verdauten Proben wurden die entsprechenden unverdauten Proben auf die Membran geblottet. Bei allen mit dem Restriktionsenzym *BST* 98I verdauten humanen Proben war fast kein Signal sichtbar (Abbildung 4.3), während die unverdauten Proben starke Signale zeigten, dies entspricht den Erwartungen (siehe Kapitel 5.5). Die schwachen Signale bei einigen Tieren blieben auch bei den verdauten Proben unverändert.

4.4 MtDNA-Spezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2

Die Daten verschiedener Gendatenbanken lassen auf eine spezifische Bindung von Hummit1 und 2 an die mtDNA innerhalb der humanen Gesamt-DNA schliessen (siehe Kapitel 3.1 und 3.2). Die mtDNA-Spezifität wurde im Folgenden experimentell bestätigt. Hierzu wurden humane DNA-Proben auf derselben Membran einmal mit Hummit 1 und einmal mit Hummit 2 quantifiziert (siehe Kapitel 5.5). Die Quantifizierung mit Hummit 1 und Hummit 2 im Slot Blot ergab bei fast allen Proben die gleichen Werte (Daten nicht gezeigt). Bei den Proben, bei denen es Abweichungen gab, unterschieden sich die ermittelten DNA-Mengen um bis zu 30%. Die Quantifizierung der mtDNA in der Spermaprobe im Vergleich zur Blutprobe zeigte den erwarteten starken Unterschied, d.h. in der Spermaprobe konnte nur eine geringe Menge mtDNA detektiert werden. In der Blutprobe konnte eine signifikant größere mtDNA-Menge detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis entspricht den Angaben aus der Literatur über die geringe mtDNA-Menge im humanen Sperma

(siehe Kapitel 5.8) und bestätigt somit die mtDNA-Spezifität der Sonden Hummit 1 und 2.

Die im Southern Blot eingesetzten Proben von 1- bis 2 µg humaner Gesamt-DNA (siehe Kapitel 3.18), die einem Restriktionsverdau unterzogen wurden, zeigten die erwarteten zwei Banden der verdauten humanen mtDNA. Es waren keine weiteren Banden sichtbar (Southern Blot nicht gezeigt). Somit liegt keine detektierbare unspezifische Bindung der Sonden Hummit 1 und 2 vor.

4.5 MtDNA-Quantifizierung

Die Quantifizierungsstudie wurde mit der in dieser Arbeit entwickelten mtDNA-Quantifizierungsmethode durchgeführt, Abbildung 4.4 zeigt exemplarisch zwei Slot Blot-Bilder aus der Studie. Die Quantifizierung der humanen mtDNA in drei verschiedenen Altersgruppen zeigte keine altersabhängigen Veränderungen in den drei Altersgruppen (Abbildung 4.5). Da der Kruskis-Wallis-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen zeigte, wurden die Daten aller Testpersonen zusammengezogen, um Mittelwerte für die mtDNA-Mengen der verschiedenen Gewebe zu erhalten (Abbildung 4.6). Im Skelettmuskel war der Prozentsatz der mtDNA $1,0\% \pm 0,4\%$ (4198 ± 1679 mtDNA-Kopien) und im Herzmuskel betrug die mtDNA-Menge im Mittel $2,2\% \pm 1,3\%$ (9235 ± 5457 mtDNA-Kopien). Während der Nucleus caudatus $1,1\% \pm 0,5\%$ (4617 ± 2099 mtDNA-Kopien) und das Frontalhirn $1,0\% \pm 0,5\%$ (4198 ± 2099 mtDNA-Kopien) ähnliche mtDNA-Mengen aufwiesen, war die mtDNA-Menge im Kleinhirn mit $0,3\% \pm 0,2\%$ (1259 ± 840 mtDNA-Kopien) am geringsten. Mit der nichtparametrischen Pearson Korrelation konnte eine Korrelation der mtDNA-Menge zwischen verschiedenen Geweben innerhalb einer Person festgestellt werden, in diese Analyse wurden 36 aus den 50 untersuchten Personen eingeschlossen. So wurde eine Korrelation zwischen dem Nucleus caudatus und dem Frontalhirn ($r = 0,369$; $p < 0,05$), zwischen Frontal- und Kleinhirn ($r = 0,333$; $p < 0,05$), zwischen dem Herzmuskel und dem Nucleus caudatus ($r = 0,424$; $p < 0,05$) und zwischen Herz- und Skelettmuskel ($r = 0,424$; $p < 0,05$) festgestellt.

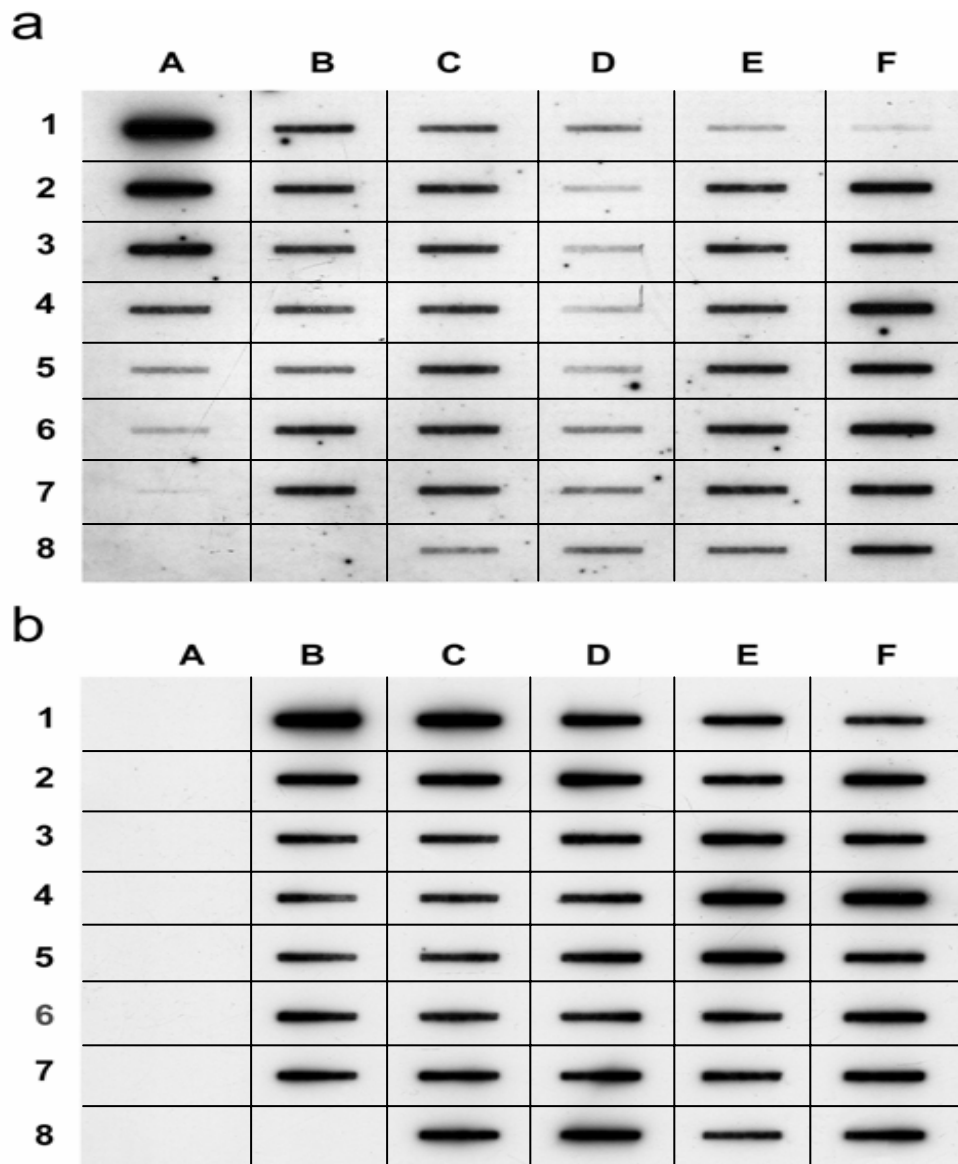


Abbildung 4.4: Quantifizierung der mtDNA durch Slot Blot mit der Sonde Hummit 1: (a) Spalte A zeigt die mtDNA-Standardreihe mit folgenden Verdünnungen: 2000 pg (A1), 1000 pg (A2), 500 pg (A3), 250 pg (A4), 100 pg (A5), 50 pg (A6), 20 pg (A7), 10 pg (A8). Die Spalten B- bis F zeigen Proben des Nucleus caudatus (B2- bis B7), Frontalhirn (C2- bis C8), Kleinhirnrinde (D2- bis D8), Skelettmuskel (E2- bis E8) und Herzmuskel (F2- bis F8). Die Slots B1- bis F1 (erste Zeile) zeigen eine K562-Standardreihe, Slot B8 ist die Negativkontrolle. (b) Die Membran aus Abbildung 4.4 (a) wurde zur Quantifizierung der humanen nukleären DNA mit der Sonde D17Z1 hybridisiert. Die K562-Standardreihe hat folgende Verdünnungen: 80 ng (B1), 60 ng (C1), 40 ng (D1), 20 ng (E1), 10 ng (F1). Die verschiedenen Gewebeproben haben ca. die gleiche Menge Kern-DNA während die mtDNA-Mengen (a) erhebliche Unterschiede aufweisen.

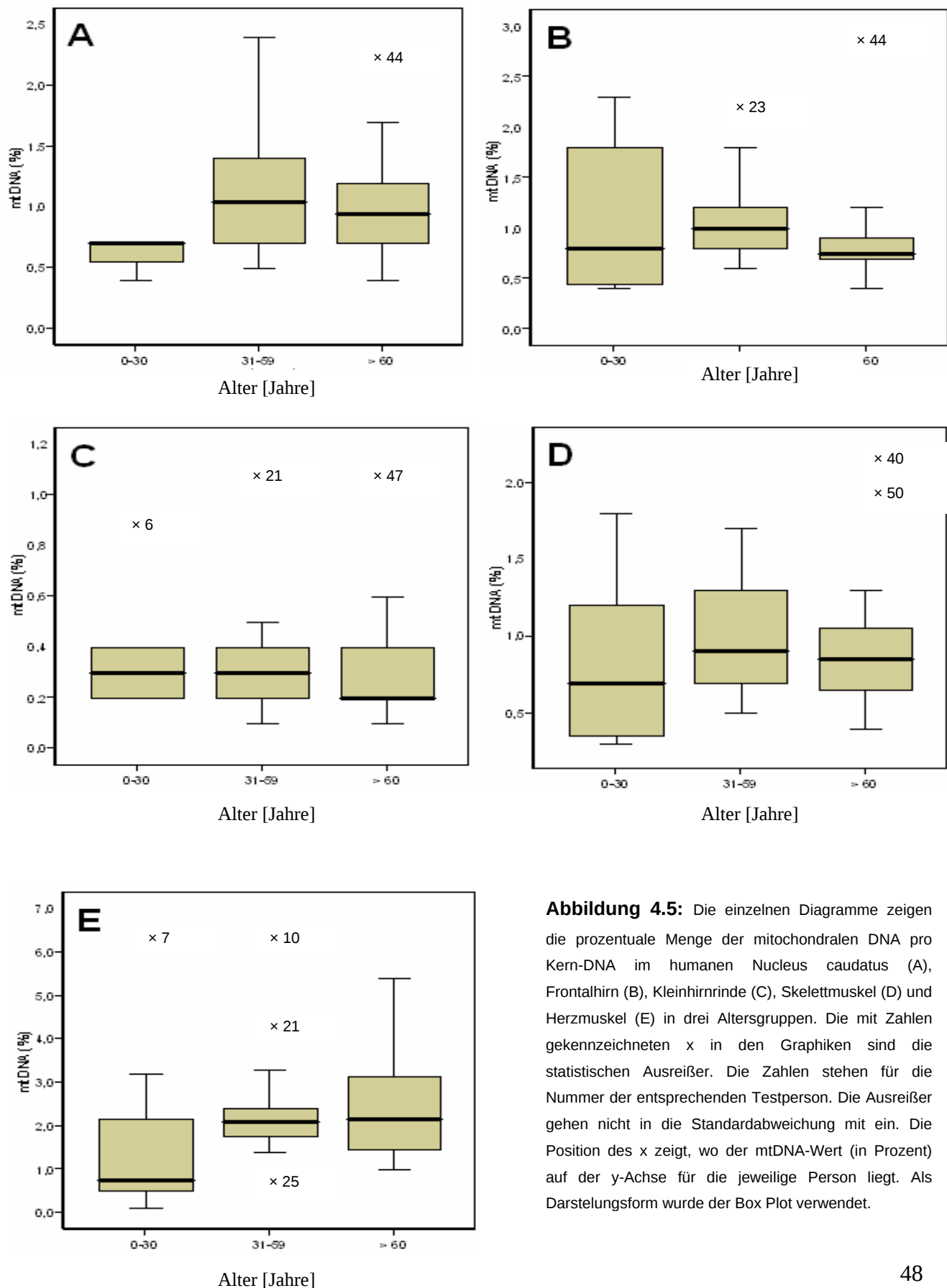


Abbildung 4.5: Die einzelnen Diagramme zeigen die prozentuale Menge der mitochondrialen DNA pro Kern-DNA im humanen Nucleus caudatus (A), Frontalhirn (B), Kleinhirnrinde (C), Skelettmuskel (D) und Herzmuskel (E) in drei Altersgruppen. Die mit Zahlen gekennzeichneten x in den Graphiken sind die statistischen Ausreißer. Die Zahlen stehen für die Nummer der entsprechenden Testperson. Die Ausreißer gehen nicht in die Standardabweichung mit ein. Die Position des x zeigt, wo der mtDNA-Wert (in Prozent) auf der y-Achse für die jeweilige Person liegt. Als Darstellungsform wurde der Box Plot verwendet.

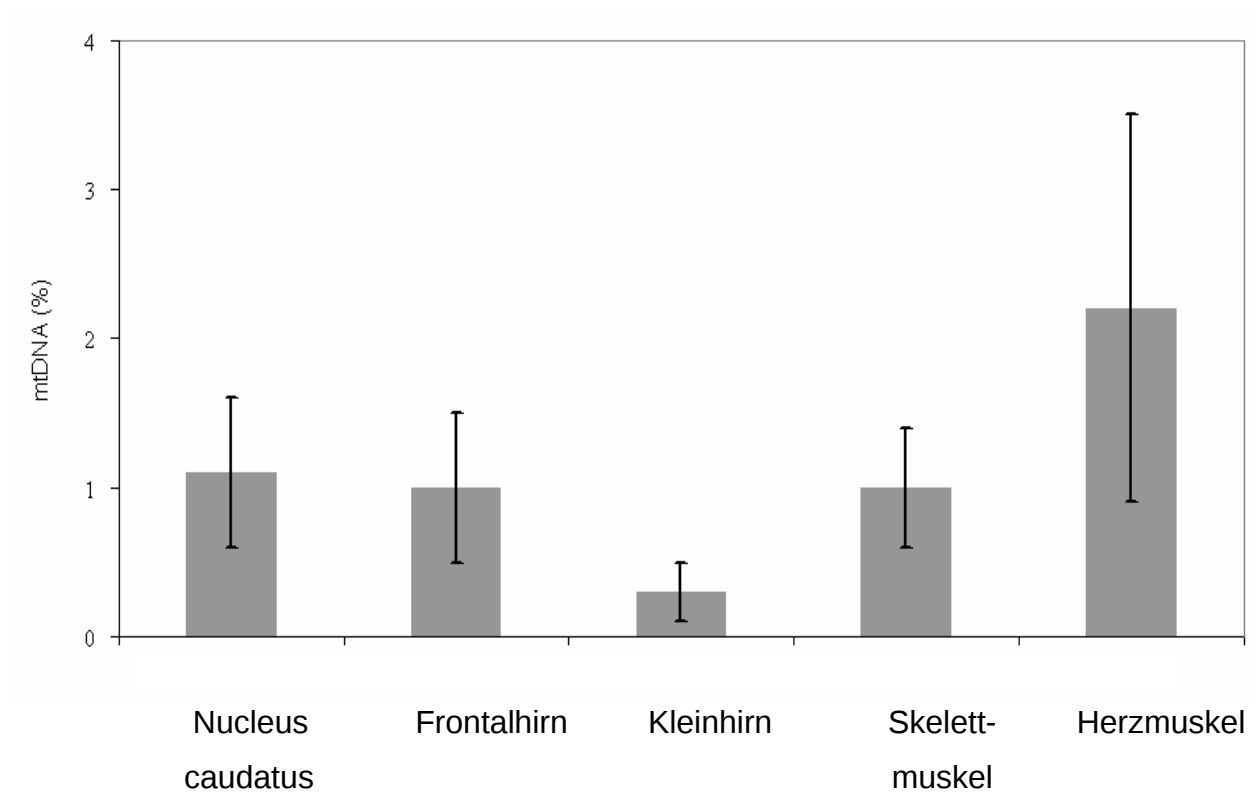


Abbildung 4.6: In dem Diagramm ist die prozentuale mtDNA-Menge pro Kern-DNA in fünf humanen Geweben dargestellt. Im Nucleus caudatus, Frontalhirn und Skelettmuskel beträgt die Menge ca. 1%. Das Kleinhirn (0.3%) und der Herzmuskel (2,2%) unterscheiden sich von den drei anderen Geweben.

5 Diskussion

Zunächst werden die hier entwickelten Methoden und anschliessend die Ergebnisse der durchgeführten mtDNA-Altersstudie diskutiert.

5.1 mtDNA-Standard

Die Länge des in dieser Arbeit verwendeten mtDNA-Standards beträgt 16262 bp, d.h. er besitzt die 0,978-fache Länge des kompletten humanen mitochondrialen Genoms. Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Standard und der mtDNA ist, dass die mtDNA zirkulär und das PCR-Produkt linear vorliegt. Dieser Unterschied in der molekularen Struktur kann aufgrund des unterschiedlichen DNA-Bindungsverhaltens an die Nylonmembran eventuell zu einem systematischen Messfehler führen. Gezeigt werden konnte dieser Unterschied im Bindungsverhalten bisher nur im Zusammenhang mit Substanzen, welche die DNA-Bindung an die Membran inhibieren, z.B. Magnesium [51]. Des Weiteren ist nicht geklärt, ob und in welchem Maß durch Lagerung, Extraktion und/oder Blotten die mtDNA linearisiert wird. Aufgrund der fast gleichen Basenpaarlänge sind ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften zu erwarten, wodurch eine Quantifizierung mittels dieses Standards aus theoretischer Sicht unbedenklich ist.

Der mtDNA-Standard wurde via Long PCR hergestellt, mit dem erhaltenen Amplifikat wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, in der das Amplifikat aufgetrennt und dann die Bande des 16,2 kb-Fragments ausgeschnitten und extrahiert wurde. So konnte sichergestellt werden, dass nur vollständige mtDNA-Fragmente in der anschließenden fluorometrischen Quantifizierung gemessen und als Standard verwendet werden.

Zusätzlich zur Agarosegelelektrophorese wurde mittels Verdau der DNA durch eine Restriktionsendonuklease und anschließenden Southern Blots geprüft, ob es sich beim Amplifikat wirklich um ein 16,2 kb-Fragment der humanen mtDNA handelte. Die Ergebnisse dieser Tests entsprachen den Erwartungen (daten nicht gezeigt). Somit

ist gesichert, dass hier ein Teil der humanen mtDNA amplifiziert wurde. Um eine exakte Quantifizierung durchzuführen, muss die Masse des mtDNA-Standards mit dem Faktor 1,0228 multipliziert werden, um den durch die geringere Nukleotidlänge des Standards bedingten systematischen Messfehler zu eliminieren.

5.2 Vorquantifizierung

Setzt man aufgrund des Ergebnisses der fluorometrischen Vorquantifizierung äquivalente Mengen humaner Gesamt-DNA von frischen Proben (maximal 4 Wochen alt) und 1- bis 2 jahrealten Proben im Slot Blot ein, zeigen die frischen Proben gleichstarke Signale, während die Signalstärke bei den alten Proben signifikant geringer ist.

Als mögliche Gründe für diese Beobachtung kommen Messfehler in der fluorometrischen Vorquantifizierung oder verändertes Bindungsverhalten stark fragmentierter DNA an die Nylonmembran sowie ein verändertes Verhalten der degradierten DNA im Slot Blot in Frage. Letzteres konnte jedoch als Ursache ausgeschlossen werden (siehe Diskussion, Kapitel 5.7).

Die fluorometrische Vorquantifizierung mit PicoGreen ist nach Herstellerangaben prinzipiell unanfällig für Kontaminationen verschiedener Art und soll ausschließlich doppelsträngige DNA messen, wobei dies stark konzentrationsabhängig ist. Alle gemessenen Proben lagen jedoch innerhalb des von Molecular Probes angegebenen linearen Messbereichs (25 pg/ml- bis 1000 ng/ml), damit scheidet eine zu hohe oder zu niedrige DNA-Konzentration als Ursache für Messfehler aus.

Die Fragmentlänge sowie das Vorliegen von einzelsträngiger DNA beeinflusst die Quantifizierung mit dem PicoGreen-Kit nicht [2].

Der Slot Blot als Methode ist für die Untersuchung forensischer Proben stark von der Vorquantifizierung abhängig, da die Hybridisierungsbedingungen immer nur innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs eine Unterscheidung von z.B. Schimpanse und Mensch erlauben. Setzt man hingegen die 1000-fache Menge Schimpansen-DNA ein, wird es zwangsläufig zu Signalen bei der Hybridisierung mit Hummit 2

kommen, obwohl diese Sonde in bestimmten Konzentrationsbereichen Mensch und Schimpansen unterscheiden kann. Da ältere humane Proben deutlich schwächere Signale als frische hervorrufen, häufig aber nicht bekannt ist, wie alt oder degradiert das Spurenmaterial ist, muss eine DNA-Menge eingesetzt werden, bei der auch alte humane Proben noch ein Signal geben. Handelt es sich bei der Spur aber um frisches tierisches Material, welches nur beim Einsatz größerer Mengen frischer DNA ein schwaches Signal produziert, ist durch den Slot Blot nicht zu entscheiden, ob es sich um altes humanes oder frisches tierisches Material handelt. Da weder die hier verwendete fluorometrische noch die photometrische Quantifizierung sich als geeignet erwiesen haben, Proben verschiedenen Alters einheitlich zu quantifizieren, müssen andere Methoden zur Differenzierung von humaner und tierischer DNA verwendet werden, bis es verlässlichere Vorquantifizierungsmethoden gibt. Als tauglich erwies sich z.B. die zusätzliche Verwendung von *BST 98I* (siehe Kapitel 4.3.3, „Humanspezifität der Sonde Hummit 2“).

5.3 Sondensensitivität

Die Sondensensitivität liegt unter Bedingungen, für die eine mtDNA-Spezifität der Sonde angenommen werden kann, für Hummit 1 bei ca. 15 pg des humanen mtDNA-Standards (Fragmentlänge 16,2 kb) und für Hummit 2 bei ca. 30 pg des Standards. Führt man die Detektion mit einer digitalen Kamera statt des BioMax-Light-Filmes durch, kann die Detektionsgrenze auf ca. 1/10 - 1/20 der oben angegebenen Menge reduziert werden [17].

Aufgrund der höheren Sensitivität von Hummit 1 sollte diese Sonde unter den Bedingungen, die im Kapitel 4.3.2 („Humanspezifität der Sonden Hummit 1 und Hummit 2“) für Hummit 1 angegeben sind, für die Quantifizierung eingesetzt werden. Bedingungen, die eine Sensitivität von ca. 5 pg Standard erlauben, sind im Ergebnisteil unter Sensitivität von Hummit 1 angegeben. Aufgrund der unspezifischen Bindungen der Sonde unter diesen Bedingungen an Lambda-, Herings- und Säuger-DNA kann nicht ausgeschlossen werden, dass es auch unspezifische Bindungen an die humane Kern-DNA gibt. Somit sollten diese Bedingungen erst verwendet werden,

wenn reine Kern-DNA zur Verfügung steht, die als Negativkontrolle eingesetzt werden kann.

Die Chance, dass die Sondensequenz zufällig in der Kern-DNA vorkommt, ist extrem gering. Allerdings ist in der Literatur das Vorkommen von Pseudogenen, d.h. von mitochondrialen Sequenzen, deren Länge ca. 50 bp [57] oder mehr [43] beträgt, in der humanen Kern-DNA beschrieben. Aufgrund der zur Zeit in den Gendatenbanken („National Center of Biotechnology Information“ und „European Molecular Biology Laboratory“) verfügbaren Daten und verschiedener Hybridisierungstemperaturberechnungen für die größten homologen Sequenzen aus der humanen Kern-DNA ist eine unspezifische Bindung der Sonden Hummit 1 oder Hummit 2 an Kern-DNA allerdings nicht zu erwarten. Wenn es trotzdem zu einer Bindung an humane nukleäre DNA käme, wäre dies nur von Bedeutung, wenn die entsprechende Sequenz deutlich häufiger als einmal innerhalb der Kern-DNA vorkäme, da in humanen Zellen bis zu 600.000 Kopien (Eizelle) mitochondrialer DNA vorliegen. Selbst Spermien, die den geringsten Mitochondriengehalt haben, enthalten im Durchschnitt 700 mtDNA-Kopien [27].

5.4 Die Sensitivität der Sonden im Vergleich

Fridez und Mitarbeiter [30] haben mehrere mitochondriale Oligonukleotidsonden mit der Zielsetzung entwickelt, dass diese spezifisch an die mtDNA von Hund oder Katze binden. Die Sequenzen liegen im Cytochrom B-Gen der Tiere. Es gelang ihm nicht, die mtDNA eines einzelnen Haares mit Wurzel nachzuweisen. Ein einzelnes frisch entnommenes Haar enthält maximal 200 ng und ein Schamhaar weniger als 10 ng DNA [39].

Der Nachweis von 100 pg reiner mtDNA war zumindest mit einer Sonde möglich, wobei keine genauen Angaben zur Spezifität unter diesen Bedingungen gemacht werden. Als Substrat verwendete Fridez ebenfalls CDP-Star. Im Unterschied zu der in dieser Arbeit verwendeten Detektion nahm Fridez direkt markierte Sonden. Bei der Verwendung der direkt markierten Sonde D17Z1 kann nach längerer Lagerungszeit ein Sensitivitätsabfall festgestellt werden. Dies ist bei den mit Digoxigenin markierten

Sonden nicht der Fall, wenn der Antikörper innerhalb seines Haltbarkeitsintervalls verwendet wird.

Im Vergleich der Sonden von Fridez mit Hummit 1/Hummit 2 kann bezüglich der Sensitivität festgestellt werden, dass Hummit 1 und 2 sensitiver sind, wobei aufgrund mangelnder Angaben von Fridez die Daten nicht genau und auch nicht unter dem Aspekt einer gleichen Spezifität verglichen werden konnten.

In einer Arbeit, die einer ähnlichen Fragestellung wie die hier vorgelegte nachgegangen ist, wurden zwei verschiedene Sonden getestet: So1 (55 bp) und So2 (368 bp) [84]. Die Sensitivität der Sonde So1, die direkt mit Alkalischer Phosphatase markiert ist, beträgt ca. 15 ng und die von So2, welche mit Digoxigenin markiert ist, ca. 1 pg des dort zugrunde gelegten mtDNAStandards. Dieser Standard ist ein 368 bp langes Fragment der mtDNA, d.h. es ist der Gegenstrang zu So2. Der verwendete mtDNA-Standard entspricht, unter dem Aspekt der Basenpaarlänge betrachtet, ca. dem 45sten Teil der mtDNA, d.h. in 1 pg dieses Standards befinden sich erheblich mehr Kopien als in 1 pg des hier verwendeten Standards, womit die Sensitivitäten der Sonden Hummit 1 und 2 nicht vergleichbar mit der Sensitivität der Sonde So2 sind. Bei beiden Methoden wurde die Dig-Markierung, Alkalische Phosphatase und CDP-Star verwendet.

Vergleicht man diese beiden Methoden bezüglich der Tauglichkeit mitochondriale DNA zu quantifizieren, so zeigt sich, dass die Sonde So2 in einem Bereich liegt, für den zahlreiche Deletionen beschrieben wurden. Hingegen ist für den Sequenzabschnitt der Sonde Hummit 1 bisher keine Deletion beschrieben worden [90]. Ob dies ein für die Quantifizierung relevanter Faktor ist, ist nach derzeitigem Wissensstand fraglich, da der Anteil der deletierten DNA, der mit einer konventionellen PCR mit einem Primerpaar ermittelt wurde, ca. 0,01% - 0,3% der gesamten mtDNA beträgt [22, 73, 77]. Die Anzahl und Größe der hiermit dargestellten Deletionen ist vom Primerpaar abhängig. Vermutlich stellt die auf diese Weise ermittelte Deletionsmenge aber nur die Spitze des Eisberges dar [85]. Hayakawa und Mitarbeiter untersuchten die mtDNA humaner Gewebe unterschiedlichen Alters [37]. Hierbei konnten in Kardiomyozyten von 97 Jahre alten Personen 358 Typen deletierter mtDNA detektiert werden, wovon 280 einen oder beide Replikationsursprünge nicht mehr enthielten. In dieser Untersuchung konnte

festgestellt werden, dass die Wildtyp-DNA auf bis zu 11% reduziert wurde, auch andere Autoren konnten eine starke Zunahme von Deletionen im Alter feststellen [48]. Zumindest bei Geweben von älteren Patienten ist es offensichtlich wichtig, eine Sondenzielsequenz zu haben, die auf möglichst wenigen Deletionen liegt. Für exakte quantitative Untersuchungen der mtDNA ist es daher empfehlenswert, ab einem bestimmten Patientenalter, z.B. über 60 Jahre, eine Quantifizierung mittels zweier verschiedener mtDNA-Sonden zu verwenden, die möglichst wenige bzw. wenig gemeinsame Deletionen in ihrer Zielsequenz haben. Hierfür sind Hummit 1 und Hummit 2 sehr gut geeignet.

5.5 Spezifität der Methode

Für die Diskussion der Spezifität der beiden Sonden müssen im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit zwei verschiedene Aspekte betrachtet werden. Zum einen die selektive Bindung von Hummit 1 und Hummit 2 an die mtDNA innerhalb der humanen Gesamt-DNA und zum anderen die Humanspezifität der beiden Sonden.

Dass Hummit 1 und Hummit 2 nur an die mtDNA binden, ist aufgrund mehrerer Versuche sehr wahrscheinlich, kann aber nicht bewiesen werden.

Im Folgenden werden die verschiedenen Versuche beschrieben, aufgrund derer angenommen werden kann, dass die Sonden spezifisch an humane mitochondriale DNA binden.

Im Southern Blot mit humaner Gesamt-DNA konnten bei Templatemengen von 1-2 µg nur Banden auf Höhe von 16,5 kb festgestellt werden. Ein Restriktionsverdau, der die mtDNA linearisiert und in zwei Fragmente teilte, wobei Hummit 1 an das eine und Hummit 2 an das andere Fragment binden sollte, ergab mit anschließendem Southern Blot ebenfalls nur die erwarteten Banden. Da im Southern Blot die DNA aufgetrennt wird, ist es möglich, dass eventuell zu den Sonden homologe Sequenzen, die auf verschiedenen Fragmenten der Kern-DNA liegen, so weit voneinander getrennt werden, dass ihr jeweils schwaches Signal, obwohl es in der Summe sichtbar gewesen wäre, nicht sichtbar war. So ist dieser Versuch zwar kein Beweis, aber doch ein Indiz für die mtDNA-Spezifität der Methode. Bewiesen werden

kann mit dem Southern Blot experimentell jedoch, dass eine einzige homologe Sequenz auf der Kern-DNA nicht ausreichend ist, um in dem angegebenen DNA-Mengenbereich ein Signal hervorzurufen. Die eingesetzte Gesamt-DNA-Menge entsprach dem 20-40-fachen der im Slot Blot eingesetzten Menge.

In einem weiteren Versuch wurde Gesamt-DNA aus humanem Sperma eingesetzt. Hier wurde erwartet, dass das Signal für z.B. 100 ng Gesamt-DNA aus Sperma deutlich schwächer ist als das für 100 ng Gesamt-DNA aus Blut. Der Versuch wurde unter den Bedingungen des Standardprotokolls für die jeweilige Sonde mit Hummit 1 und Hummit 2 durchgeführt. Die aus Sperma extrahierte mtDNA ergab ein schwaches Signal, während die anderen Proben die erwarteten Signale ergaben. Deshalb ist es sehr unwahrscheinlich, dass es quantitativ relevante Bindungen an die Kern-DNA gibt. Abschließend wurden mehrere Membranen zuerst mit Hummit 1 und dann mit Hummit 2 hybridisiert oder umgekehrt und es wurde verglichen, ob die gleichen mtDNA-Mengen detektiert werden konnten. Dies war bei fast allen Proben der Fall. Mögliche Gründe für vereinzelt abweichende Werte sind Mutationen in den Sondenzielsequenzen, die zur verminderten Bindung der Sonden an die Zielsequenz geführt haben, oder Deletionen, die die Zielsequenz einer der beiden Sonden einschließen, nicht aber die Zielsequenz der anderen. Dass mittels beider Sonden fast alle Proben gleich quantifiziert wurden, spricht deutlich für die mtDNA-Spezifität der Sonden. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die Zielsequenzen beider Sonden, die über 1 kb auf der mtDNA auseinander liegen, mehrmals und in ähnlicher Häufigkeit auf der Kern-DNA vorkommen, z.B. in Form von Pseudogenen. Die Ergebnisse dieser Versuche legen nahe, dass die in dieser Arbeit entwickelten Methoden geeignet sind, mitochondriale DNA innerhalb humaner Gesamt-DNA zu quantifizieren.

Der zweite Aspekt der Spezifität der Methode bezieht sich auf die Selektivität der Bindung der Sonden an humane DNA. Hierzu wurde die DNA verschiedener Tiere getestet. Von den beiden Sonden ist Hummit 2 die spezifischere. So gelang es z.B. mit Hummit 2, den *Pan paniscus*, den *Pan troglodytes* (zwei Schimpansenarten) sowie den *Gorilla gorilla gorilla*, dies sind laut EMBL Datenbank die drei nächst homologen Tiere, vom Menschen zu differenzieren. Dies gelang mit Hummit 1 nur zum Teil. Die Ursache für die höhere Spezifität der Sonde Hummit 2 könnte durch die

Positionen der Punktmutation zu den Affen bedingt sein. So liegt diese bei Hummit 2 an Position 11, während die beiden Mutationen von Hummit 1 an den Position 2 und 3 (vom 5'-Ende ausgehend) liegen. Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben in der Literatur, in denen darauf hingewiesen wird, dass Punktmutationen, die mittels Sonden differenziert werden sollen, am besten diskriminiert werden können, wenn die Mutation in der Sondenmitte liegt [59]. Ebenfalls wird darauf verwiesen, dass für eine PCR die Mutation möglichst nahe am 3'-Ende liegen sollte. Somit ist der Gegenstrang von Hummit 1 optimal für die Entwicklung einer humanspezifischen PCR eines Fragments der mtDNA geeignet.

Die eindeutige Abgrenzung von humaner DNA gegenüber Affen-DNA ist nur möglich, wenn ähnliche Probenmengen eingesetzt werden. Hierzu ist eine genaue Vorquantifizierung nötig. Sollte dies nicht möglich sein, bietet das Verdauen eines Probenteils mit *BST* 98I während der andere Teil nicht mit *BST* 98I verdaut wird und einer anschließenden Hybridisierung mit Hummit 2 eine sichere Methode zur Differenzierung humaner und tierischer DNA, da es ausschließlich bei der verdauten menschlichen Probe zum Signalausfall kommt. Mit Hummit 1 konnte von den drei Affen zwar nur der Gorilla gegen den Menschen abgegrenzt werden. Trotzdem würde man aufgrund dieses Ergebnisses erwarten, dass keine quantitativ relevanten Bindungen an die DNA heimischer Säuger erfolgen sollte. Hier kam es unter den maximal stringenten getesteten Bedingungen zu Bindungen an Schaf-, Schwein-, Hund- und Kaninchen-DNA. Die Schafs-DNA bedingte bei den Versuchen mit Hummit 1 die stärksten Signale. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten für diese Ergebnisse. Zum einen homologe mitochondriale Sequenzen bei den Tieren (1) und zum anderen homologe Sequenzen auf der nukleären DNA der Tiere (2).

Die in den Gendatenbanken verfügbaren Daten schließen Punkt 1 faktisch aus, da alle Säuger, die in den Blots Signale ergaben, wesentlich mehr Mutationen bezüglich der humanen Sequenz aufweisen als die Affen, die in den Blots keine Signale hervorriefen. Die einzig denkbare, obwohl unwahrscheinliche Möglichkeit wäre, dass es infolge von Mutationen der hier untersuchten Tiere zu ihren Artgenossen, deren Sequenzen in die Datenbanken eingespeist wurden, zu einer homologen Sequenz kam.

Pseudogene (siehe Kapitel 5.3, „Sondensensitivität“) könnten für homologe Sequenzen im Kern verantwortlich sein. Pseudogene stellen mitochondriale Sequenzen dar, die in die Kern-DNA eingebaut wurden und dort ohne bisher bekannte Funktion zufällig verstreut vorkommen. Diese Sequenzen könnten kurz nach der Aufzweigung der Herkunftslinien von Mensch und z.B. Schaf, bei diesem in die nukleäre DNA ausgelagert worden sein. Im Kern wären diese Sequenzen dann erheblich stärker, aufgrund der DNA-Reparaturenzyme und der Aufwicklung der DNA auf Histone konserviert worden, wobei dann noch nicht geklärt wäre, warum die humane mtDNA sich nicht verändert haben sollte. Auch diese Möglichkeit ist also eher unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit für homologe Sequenzen in der tierischen nukleären DNA wäre, dass es zufällig eine homologe Sequenz gibt. Doch dann müsste diese vermutlich auch noch mehr als einmal vorkommen, um ein Signal hervorrufen zu können.

5.6 Sondentauglichkeit

Die Mutationen, die man mit einem Oligonukleotid differenzieren will, sollten idealerweise in der Mitte der Sonde liegen und von den Basen A/T nach G/C [59] erfolgen. Für Sonde Hummit 1 treffen beide Kriterien nicht zu. Trotzdem wurde Hummit 1 als Sonde gewählt, da sie zwei Mutationen zum nächst homologen Tier (dem Schimpansen) hat und außerdem nur eine relevante Mutation für den Menschen bekannt ist [90].

Die Mutation von Hummit 2 zum Schimpansen liegt in der Sondenmitte von T nach C und ist somit optimal. Innerhalb der humanen Population sind sechs Mutationen bekannt [90].

Obwohl nur eine Sonde die Optimalanforderungen bezüglich der Differenzierung zwischen Mensch und Tier erfüllt, wurden beide verwendet, da es nicht möglich war, eine weitere geeignete Sequenz zu finden [90]. Da für beide Sonden innerhalb der humanen Population Punktmutationen beschrieben sind, sollten sowohl für forensische als auch für quantitative Untersuchungen mehrere Sonden verwendet

werden. Experimentell konnte in allen bisher untersuchten humanen Proben (ca. 220) ein Signal detektiert werden. Es war z.T. ebenfalls möglich, Affen vom Menschen zu differenzieren, wobei dies mit der Sonde Hummit 2 besser gelang als mit Hummit 1.

Da beide Sonden in einem Bereich des mitochondrialen Genoms liegen, der wenig Deletionen (für Hummit 1 keine) aufweist [90] und für beide Sonden eine relevante Bindung an Kern-DNA ausgeschlossen werden kann, sind sie für eine Quantifizierung mitochondrialer DNA von Patienten mit verschiedenen Krankheiten und aller Altersgruppen geeignet.

Die forensische Anwendung ist aufgrund der positiven Signale bei einigen heimischen Säugern für Hummit 1 nicht möglich. Hummit 2 stellt aber eine sensitive humanspezifische Sonde dar. Es ist aber anzumerken, dass es aufgrund der unvollständigen Datenlage bezüglich der tierischen Sequenzen unbedingt notwendig ist, für ähnliche Fragestellungen mehrere Sonden zu testen. In Ermangelung weiterer geeigneter Sequenzen konnten in dieser Arbeit nur die zwei beschriebenen Sonden getestet werden.

5.7 Quantifizierung

Der Slot Blot ermöglicht bei Verwendung eines geeigneten Standards, eine Quantifizierung, durch die nicht nur die Masse der mtDNA ermittelt werden kann, sondern auch ihre Kopienzahl/Gesamt-DNA-Menge. Der hier verwendete mtDNA-Standard erfüllt diese Anforderungen. Deshalb ist man in der Lage, verlässliche Angaben über die Kopienzahl der mtDNA in einer definierten Menge Gesamt-DNA zu machen.

Dass eine genaue Quantifizierung der humanen mtDNA mittels des Slot Blots möglich und anderen Methoden überlegen ist, konnte auch von anderen Autoren gezeigt werden [27]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass mit dem Slot Blot reproduzierbare Ergebnisse bei der Quantifizierung der DNA ermittelt werden können [91].

Die orientierende DNA-Mengenbestimmung kann mittels Photo- oder Fluorometer erfolgen. Somit müssen für eine genaue Bestimmung der Gesamt-DNA-Menge

weitere Verfahren zur Anwendung kommen. Um den experimentellen Aufwand in einem akzeptablen Rahmen zu halten, wird für die mtDNA-Kopienzahlbestimmung/Gesamt-DNA-Menge oder für die Bestimmung des prozentualen Anteils der mtDNA an der Gesamt-DNA folgendes Vorgehen vorgeschlagen: Zuerst erfolgt eine Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Fluorometer, dann wird ein Slot Blot und eine Hybridisierung mit Hummit 1 durchgeführt. Zuletzt wird die Membran gestrippt und eine Rehybridisierung mit der Sonde D17Z1 durchgeführt.

Dieses Vorgehen ist insofern sinnvoll, als dass man zumindest eine ähnliche Gesamt-DNA-Mengen einsetzt und dann mittels zweier verschiedener Sonden, eine für die Kern-DNA (D17Z1) sowie eine für die mtDNA (Hummit 1), die genauen Mengen von nukleärer und mitochondrialer DNA ermittelt. Aus diesen Werten kann dann der prozentuale Anteil oder die Kopienzahl der mtDNA/Gesamt-DNA berechnet werden.

Errechnet man anhand des Standards die Kopienzahl der Sensitivitätsgrenze (15- bis 30 pg mtDNA), so ergibt sich ein Wert von ca. 1,7 Millionen Kopien. Da andere Autoren (siehe auch 5.4) ähnliche Sensitivitätsgrenzen ermittelt haben [30, 84], scheint dies eine durch die Methode bedingte Detektionsgrenze zu sein. Damit ist der Slot Blot zwar als Methode zur Quantifizierung geeignet, stellt aber keine hoch sensitive Methode dar. Eine Möglichkeit, die Sensitivität zu erhöhen und den Messbereich zu erweitern, stellt die dynamische Detektion mit einer digitalen Kamera dar [17]. Mit dieser Detektionsmethode wären wahrscheinlich 85000- bis 170000 Kopien die Sensitivitätsgrenze.

Die Gründe für die im Hinblick auf die Kopienzahl relativ geringe Sensitivität liegen in den sehr stringenten Bedingungen der Hybridisierung. So liegt die Schmelztemperatur zwischen 52°C und 52,7°C (für Hummit 1), je nach verwendeter Formel für die Schmelztemperaturberechnung, die Hybridisierungstemperatur von Hummit 1 beträgt aber 58°C. Da die Schmelztemperatur als diejenige Temperatur definiert ist, bei der 50% der Hybride dissoziiert sind und Bindungskurven für derartige Prozesse immer einen sigmoidalen Verlauf aufweisen, liegen bei 58°C deutlich weniger als 50% der Sonde an die Ziel-DNA gebunden vor. Allein dadurch wird die nachweisbare Kopienzahl erheblich erniedrigt. Aber auch bei weniger stringenten Bedingungen wäre die nachweisbare Kopienzahl relativ hoch.

Da die Detektion mittels der Digoxigenin-Markierung wie auch die radioaktive Markierung hoch sensitiv ist und andere Autoren ähnliche Sensitivitätsgrenzen angegeben haben, stellt sich die Frage nach dem Grund für die gefunden Sensitivitätsgrenzen. Als mögliche Ursachen müssen die Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase bei einem relevanten Prozentsatz der Antikörper (1), die unvollständige Bindung der DNA an die Membran (2) sowie die räumlich bedingte Hemmung der Sondenbindung (3) genannt werden.

Zu (1): Längere Lagerungszeiten könnten zur partiellen Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase führen, wobei im Rahmen dieser Arbeit kein Sensitivitätsabfall infolge längerer Lagerungszeiten festgestellt werden konnte. Nach Angaben von Roche liegen ca. 90% der Alkalischen Phosphatase im Haltbarkeitsintervall aktiv vor.

Zu (2): Es ist ungeklärt, wie viel Prozent der aufgetragenen Proben-DNA von der Membran gebunden werden können und inwiefern bei einer Erhöhung der Probenmenge dieser Prozentsatz durch die räumliche Hemmung der Moleküle untereinander reduziert wird. Es ist außerdem denkbar, dass unvollständig oder nicht gebundene DNA-Moleküle bei den folgenden Waschschritten wieder abgewaschen werden. Eine weitere Möglichkeit des DNA-Verlustes ist, bei stark degradierter DNA und damit verbundener Fragmentierung, ein Durchsaugen der DNA durch die Membran während des Transfers. Da beim Slot Blot Fragmente, die kleiner sind als 300 bp, durch die Membran gesaugt werden [78]. Die mtDNA ist nicht so komplex wie die Kern-DNA verpackt und somit instabiler, eine Fragmentierung der mitochondrialen DNA ist infolge längerer Lagerungszeiten somit nicht unwahrscheinlich. Es konnte aber gezeigt werden, dass das Durchsaugen von DNA quantitativ kein wesentlicher Aspekt der Sensitivitätsminderung ist [16]. Trägt man länger gelagerte Proben im Slot- oder Dot Blot auf und vergleicht sie mit frisch extrahierten Proben, die ebenfalls in beiden Blots eingesetzt wurden, so ist im Slot- und Dot Blot der gleiche Signalunterschied zwischen frischen und alten Proben festzustellen (Daten nicht gezeigt). Die frischen Proben haben immer das stärkere Signal. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Methode des Slot Blots im Vergleich zum Dot Blot keinen relevanten DNA-Verlust hervorruft. Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine Arbeit [84], in der ein Standard verwendet wurde, der 368 bp lang ist. Es konnte bis zu 1 pg Standard nachgewiesen werden.

Zu 3: Die diploide Kern-DNA des Menschen wiegt ca. 7,4525 pg (berechnet nach DNA-Molmasse 660 g/mol [71] und der Basenzahlangabe (3.400.000.000 bp)). In einer Arbeit von Sodmann, dessen mtDNA-Mengen [84]) vermutlich nur als Richtwerte zu betrachten sind, wurde für aus Leukozyten isolierte humane DNA ein Anteil von ca. 1,84% mtDNA an der Gesamt-DNA ermittelt. Die durchschnittliche Masse der mtDNA pro humanem Leukozyt ist somit ca. 0,137126 pg. Da eine einzelne mtDNA ca. 18,159 ag wiegt, ergibt sich daraus eine mtDNA-Kopienzahl pro Leukozyt von ca. 7551. Eine komplett intakte diploide nukleäre DNA enthält 46 Chromosomen (Moleküle). Da 1 ng Gesamt-DNA die DNA aus ca. 140 Leukozyten enthält, entspräche dies zuzüglich der mtDNA-Moleküle ca. 1.000.000 DNA-Molekülen. Unter der Bedingung, dass in der fluorometrischen Vorquantifizierung keine durch RNA oder andere Kontaminationen bedingten erhöhten Werte gemessen wurden, ist also davon auszugehen, dass ca. 1.000.000 DNA-Moleküle mit 1 ng reiner Gesamt-DNA aus humanem Leukozyten auf die Membran geblottet werden. Bei dieser Molekülzahl wird es zwangsläufig zu diversen Überlagerungen der einzelnen Moleküle kommen. Wenn die DNA stark degradiert ist, kann die Sondenanlagerung durch die degradierte niedermolekulare DNA physikalisch verhindert werden [3]. Ob dies prozentual relevant ist, ist derzeit nicht beurteilbar, aber es scheint plausibel, dass auch dieser Faktor zu einer nicht unerheblichen Sensitivitätsminderung führt.

Der Slot Blot ist eine robuste Quantifizierungsmethode, die innerhalb des Messbereichs genau und gut reproduzierbar misst [17].

5.8 MtDNA-Quantifizierung

Um die Hypothese der Zunahme der mtDNA-Menge pro diploider Kern-DNA im Alter zu prüfen, wurde die mtDNA-Menge pro diploider Kern-DNA in fünf verschiedenen Geweben von 50 altersentsprechend gesunden Personen untersucht. Aufgrund der altersbedingten strukturellen Veränderungen (z.B. Deletionen) der humanen mtDNA ist es notwendig, eine robuste und sensitive Quantifizierungsmethode zu verwenden. Die in dieser Arbeit entwickelte Quantifizierungsmethode erfüllt diese Anforderungen.

Die mtDNA-Kopienzahl hängt stark vom Energiebedarf des jeweiligen Gewebes ab, die Anzahl von mtDNA-Kopien in verschiedenen Geweben ist Gegenstand aktueller Studien. Die mtDNA-Kopienzahl pro diploider Kern-DNA in humanen Spermien beträgt ca. 700 [27], in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) 223- bis 854 und in Muskelfasern 1075- bis 2794 [12], in Neuronen 1200- bis 10800 mit einer großen interindividuellen Schwankung [19] und in Leberzellen bis zu 25000 [13]. In der hier durchgeführten Untersuchung wurden für die verschiedenen Gewebe folgende durchschnittliche mtDNA-Mengen pro diploider Kern-DNA und Kopienzahlen bestimmt: Im Skelettmuskel entsprach der Prozentsatz der mtDNA $1,0\% \pm 0,4\%$ (4198 ± 1679 mtDNA-Kopien) und im Herzmuskel betrug die mtDNA-Menge im Mittel $2,2\% \pm 1,3\%$ (9235 ± 5457 mtDNA-Kopien). Während der Nucleus caudatus $1,1\% \pm 0,5\%$ (4617 ± 2099 mtDNA-Kopien) und das Frontalhirn $1,0\% \pm 0,5\%$ (4198 ± 2099 mtDNA-Kopien) ähnliche mtDNA-Mengen aufwiesen, war die mtDNA-Menge im Kleinhirn mit $0,3\% \pm 0,2\%$ (1259 ± 840 mtDNA-Kopien) am geringsten.

In einer Studie von Miller und Mitarbeitern wurden mittels Real-Time-PCR für Skelettmuskel (3650 ± 620 mtDNA-Kopien/KernDNA) und Herzmuskel (6970 ± 920 mtDNA-Kopien/Kern-DNA) ähnliche mtDNA-Kopienzahlen/Kern-DNA gefunden wie in der hier vorgelegten Arbeit [65]. In einer anderen Studie wurden für den Skelettmuskel niedrigere mtDNA-Kopienzahlen/Kern-DNA (1811 ± 546) ermittelt [12]. Die z.T. niedrigeren mtDNA-Kopienzahlen/Kern-DNA können beim Skelettmuskel durch die Analyse unterschiedlicher Muskeln bedingt sein. Beim Herzmuskel sind die Unterschiede vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Arbeitsgruppe um Miller die untersuchten Proben aus dem rechten Vorhof entnahm, während in der hier durchgeführten Studie die Proben aus dem linken Ventrikel stammen. Die Frage, wie die mtDNA-Kopienzahl reguliert wird, ist seit Jahren Gegenstand der Diskussion und wurde ausführlichst diskutiert (z.B. [68]). Die Daten der hier vorgelegten Studie zeigen, dass es einen systemischen Einfluss (z.B. Sport, oxidativer Stress, Lebensstil, genetische Disposition) auf die mtDNA-Kopienzahlen gibt. Da verschiedene Gewebe eines Individuums eine statistisch signifikante Korrelation der mtDNA-Mengen haben. In Zellkultur-Experimenten konnte eine inverse Korrelation zwischen der mtDNA-Länge und der Kopienzahl festgestellt werden, wobei die absolute Zahl der mitochondrialen Nukleotide konstant blieb. Es wurde postuliert,

dass die mtDNA-Kopienzahl durch mitochondriale dNTP-Pools oder modulierende Faktoren der mitochondrialen Replikation reguliert wird [69, 87, 88]. Zellkultur-Experimente haben gezeigt, dass eine Reduktion der Atmungskettenaktivität auf 50- bis 70% der ursprünglichen Aktivität nach 24h zu einer Hochregulation der mRNA-Mengen der Atmungskettengene führten [86]. Somit könnte die Kompensation der Degradation der mtDNA durch eine Hochregulation der mitochondrialen mRNA-Mengen erfolgen.

Dass die Menge der Deletionen der mtDNA altersabhängig ansteigt, konnte bereits gezeigt werden [23, 24, 53, 56, 61, 62, 85]. Die Hypothese, dass die im Alter steigende Menge der mitochondrialen Deletionen durch einen Feedback-Mechanismus die mtDNA-Kopienzahl kompensatorisch hochreguliert, konnte durch die Daten in der hier vorgelegten Arbeit nicht bestätigt werden. In fünf verschiedenen Geweben von 50 Individuen konnte keine signifikante Veränderung der absoluten mtDNA-Mengen in drei verschiedenen Altersgruppen festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Befunden anderer Studien, in denen ein signifikanter Anstieg der mtDNA-Kopienzahlen/Kern-DNA in älteren Personen gefunden wurde [10, 11, 54, 55]. In der Studie von Barrientos wurden 13 Individuen untersucht, von denen drei unter 45 Jahren waren [11]. Es ist möglich, dass die hier gefunden Unterschiede durch die geringe Fallzahl bedingt sind. In der Studie von Lee und Mitarbeitern wurde ebenfalls ein Anstieg der mtDNA-Menge mit zunehmendem Alter festgestellt [54]. In dieser Studie wurde Lungengewebe untersucht. Die Lunge stellt aber ein Organ dar, das wie kein anderes toxischen Stoffen wie z.B. Ozon, Benzolen und Zigarettenrauch ausgesetzt ist. Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass die Lunge einen anderen Alterungsprozess als die meisten Organe durchläuft. Lee und Mitarbeiter entnahmen die untersuchten Proben außerdem von pulmonal erkrankten Patienten, die sich einer Lungenoperation unterziehen mussten [54]. Im Gegensatz dazu wurden in der hier vorgelegten Studie nur altersentsprechend gesunde Individuen untersucht, deren Tod akut oder perakut eintrat, chronische Erkrankungen, die zu morphologischen Gewebsveränderung führen, wurden durch die Befunde der mikroskopischen und makroskopischen Begutachtung während der Obduktion ausgeschlossen. Andere Daten von Lee und Mitarbeitern wurden in vitro

durchgeführt, so dass die Zunahme der mtDNA in dieser Studie vielleicht auf den Unterschied zwischen der in vitro- und in vivo-Situation zurückzuführen ist [55].

Studien, die die in vivo-Situation an größeren Kollektiven untersuchten, konnten allerdings auch keinen Unterschied der mtDNA-Menge in verschiedenen Altersgruppen im Skelett- und Herzmuskel feststellen [12, 65]. Bai und Mitarbeiter untersuchten die mtDNA-Menge im humanen Blut und Skelettmuskel [8]. Während sie im Blut einen signifikanten Abfall der mtDNA-Menge fanden, war dieser Effekt im Skelettmuskel nicht nachweisbar. Bai und Mitarbeiter konnten aber zeigen, dass die mtDNA-Menge im Skelettmuskel bis zu einem Lebensalter von 5 Jahren ansteigt [8]. In der hier vorgelegten Arbeit konnte in der Altersgruppe 0-30 Jahre keine niedrigere mtDNA-Menge festgestellt werden. In dieser Altersgruppe befanden sich aber nur drei Individuen unter fünf Jahren. Innerhalb der Gruppe der unter fünfjährigen ist die mtDNA-Menge mit ca. 0,3% (1200 mtDNA-Kopien) der Kern-DNA-Menge deutlich geringer als in der Gruppe über fünf Jahre (Daten nicht gezeigt). Unsere Ergebnisse unterstützen also die Daten von Bai und Mitarbeitern.

Daten aus Tierstudien zeigen, dass die mtDNA-Kopienzahl bei älteren Ratten im Skelettmuskel und der Leber reduziert war, während sie im Herzmuskel konstant blieb [9]. Im Gehirn hingegen fand eine Zunahme statt [29]. Alle diese Daten deuten darauf hin, dass die Regulation der mtDNA-Kopienzahl spezies- und gewebespezifisch ist.

In der hier durchgeführten Studie fand sich kein Abfall der mtDNA-Menge in Skelettmuskel und Gehirn. Dies ist überraschend, da das Skelettmuskelfaservolumen in älteren Menschen (Durchschnittsalter 68 Jahre) auf das 0,66-fache von jungen Menschen (Durchschnittsalter 28 Jahre) pro Kern-DNA schrumpft [45]. Die Zellen des ZNS schrumpfen im Alter ebenfalls, dementsprechend müsste sich der Energieumsatz pro Kern-DNA gleichzeitig reduzieren. Dies wiederum sollte die Mitochondrien und demzufolge die mtDNA-Menge herunterregulieren. Das Konstantbleiben der mtDNA-Menge im Alter stellt also zumindest für das ZNS und den Skelettmuskel einen relativen Anstieg der mtDNA-Menge pro umgesetzter Energie dar.

Studien, die mittels Positronen Emissions Tomographie (PET) oder mit Single Photon Emissions Computer Tomographie (SPECT) den Glukosestoffwechsel im ZNS

untersucht haben, zeigten einen Abfall des Glukosestoffwechsels mit zunehmendem Alter im Frontalhirn und im Nucleus caudatus [38, 58, 67, 70, 75, 89]. Für das Cerebellum wurde keine Reduktion des Glukosemetabolismus nachgewiesen [58, 67, 75].

In der hier vorgelegten Studie haben wir erstmals verschiedene Hirnareale in einem großen Kollektiv von getesteten Individuen untersucht und können deshalb die mtDNA-Kopienzahl im Zusammenhang der vorliegenden Funktionsstudien des ZNS mittels PET und SPECT diskutieren. Vergleicht man den Glukosemetabolismus pro Volumeneinheit Gewebe im Cerebellum, Nucleus caudatus und Frontalhirn mit der mtDNA-Kopienzahl pro Volumeneinheit Gewebe in den entsprechenden ZNS-Arealen, zeigen sich eklatante Unterschiede (Die dazu notwendigen Berechnungen der Zellzahl pro Volumeneinheit Gewebe wurden mit den Daten aus folgenden Studien berechnet [44, 52, 83]). Während der Nucleus caudatus und das Frontalhirn einen fast gleichgroßen Glukoseumsatz pro mtDNA haben, setzt das Kleinhirn nur ca. 30% der Glukosemenge pro mtDNA-Kopie um. Diese Daten implizieren, dass es einen wesentlichen Unterschied zwischen dem Cerebellum und den anderen beiden Hirnarealen gibt. De Grey [25] postulierte in seiner Hypothese „Survival of the Slowest“, dass ein geringerer Metabolismus einer Zelle auch zu einer geringeren Schädigung der mtDNA führt. Dieser Hypothese folgend würde man für das Cerebellum eine signifikant geringere Degradation der mtDNA, z.B. weniger Deletionen, erwarten. Frühere Studien zeigten, dass das Kleinhirn ca. 1% der 4977 bp Deletion („Common Deletion“) im Vergleich zu anderen Hirnarealen hat [23, 60, 85]. Die mtDNA des Cerebellums scheint also durch einen geringeren Glukosemetabolismus oder andere gewebspezifische Faktoren, z.B. anti-oxidative Enzyme [33], vor der Degradation im Alter geschützt zu sein. Die in der hier durchgeführten Studie erhaltenen Daten unterstützen also zumindest teilweise die Hypothese „Survival of the Slowest“ [25, 49].

5.9 Empfehlungen für die Entwicklung hoch spezifischer Sonden

Im Rahmen dieser Arbeit sind diverse Probleme bezüglich der Entwicklung spezifischer Hybridisierungsbedingungen für die beiden Sonden aufgetreten. Um zumindest die Ermittlung spezifischer Bedingungen zu ermöglichen, ist es hilfreich Folgendes zu beachten:

Wie vorab beschrieben gab es Probleme mit der fluorometrischen Vorquantifizierung sowie mit einer eventuellen humanen Kontamination. Da diese die Ermittlung der spezifischen Hybridisierungsbedingungen erschwerten, ist es empfehlenswert, primär Proben zu nehmen, deren Konzentration sowie Sequenz genau bekannt sind, z.B. synthetisch hergestellte DNA-Fragmente.

Bei Verwendung einer Oligonukleotidsonde könnten beispielsweise das komplementäre Oligonukleotid sowie entsprechende Oligonukleotide der nächst homologen tierischen Sequenzen (für Hummit 2 z.B. *Pan paniscus*, *Pan troglodytes* und *Gorilla gorilla gorilla*) verwendet werden.

Ist die experimentelle Entwicklung der Bedingungen mit den Oligonukleotiden abgeschlossen, kann dann eine Bewältigung der anderen Probleme effizienter und gezielter erfolgen. Für die Experimente mit den Oligonukleotiden ist zu beachten, dass als Blot-Methode der Dot Blot verwendet wird, da Oligos beim Slot Blot durchgesaugt werden. Des Weiteren sollte vorab berechnet werden, welche Molmenge an Oligonukleotiden eingesetzt werden muss, um in sinnvollen Mengenbereichen zu arbeiten.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Sonden zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der humanen mtDNA entwickelt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der forensischen Anwendbarkeit. Als Methode wurde der Slot Blot verwendet.

Die Sondensequenzen stammen aus Sequenzbereichen, die innerhalb der humanen Population gut konserviert sind, aber diverse Sequenzunterschiede zu den Tieren aufweisen. In Zusammenarbeit mit dem EMBL-Institut in Heidelberg wurden die Sonden mit allen bekannten tierischen Sequenzen verglichen. Dabei wurden keine vollständig homologen Sequenzen gefunden. Außerdem lagen die Sondensequenzen in Bereichen der mtDNA, die nur in geringem Maße von Deletionen betroffen sind, wodurch die Quantifizierung unabhängig vom Grad der mtDNA-Degeneration war.

Im Versuchsteil der Arbeit wurden zuerst verschiedene Membranen, Filme und Substrate ausprobiert, um die Sensitivität zu erhöhen. Dabei erwiesen sich die positiv geladene Membran und das Substrat CDP-Star von Roche sowie der Bio Max Light-Film von Kodak als die besten Materialien.

Da aus der hohen Sensitivität auch ein starker Hintergrund resultierte, wurde anschließend das Detektionsprotokoll für das Digoxigenin-System verändert. Dadurch konnte eine Hintergrundreduktion ohne wesentliche Signalreduktion erreicht werden.

Nachdem die Rahmenbedingungen für eine sensitive mtDNA-Untersuchung geschaffen waren, wurden die Hybridisierungsbedingungen für die Human- sowie mtDNA-Spezifität experimentell ermittelt. Es wurde festgestellt, dass die Sonde Hummit 1 für die quantitative Untersuchung der mtDNA aufgrund ihrer hohen Sensitivität und mtDNA-Spezifität sehr gut geeignet ist. Für die Humanspezifität ist die Sonde Hummit 2 optimal geeignet, da mit dieser Sonde alle getesteten Säugetiere signifikant vom Menschen unterschieden werden konnten. Gleiches kann auch für alle getesteten Primaten konstatiert werden.

Die Untersuchung der mtDNA-Menge in verschiedenen Geweben zeigte einen relativen, aber keinen absoluten Anstieg der mtDNA-Menge in allen Geweben im Alter. Die durchschnittliche mtDNA-Kopienzahl unterschied sich in den einzelnen Geweben, so war die Kopienzahl im Herzmuskel mit 9235 ± 5457 mtDNA-

Kopien/KernDNA am höchsten und im Kleinhirn mit 1259 ± 840 mtDNA-Kopien/Kern-DNA am niedrigsten. Der Nucleus caudatus hatte 4617 ± 2099 mtDNA-Kopien/Kern-DNA, das Frontalhirn 4198 ± 2099 mtDNA-Kopien/Kern-DNA und der Skelettmuskel 4198 ± 1679 mtDNA-Kopien/Kern-DNA.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Slot Blot-Hybridisierung für das Erreichen der Ziele dieser Arbeit die besten Ergebnisse erzielt und die arbeits- sowie kosteneffizienteste Methode darstellt.

Anhang A

Geräte

A.0.1 Slot Blot

Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus, BioRad, München, Deutschland

Geldokumentationsapparat E.A.S.Y. Win32, Herolab, Heidelberg, Deutschland

Hybriboat, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA

Hybridisierungssofen: 400 HY-E, Bachofer, Reutlingen, Deutschland

A.0.2 DNA-Extraktion

Biofuge 17S/RS, Heraeus Sepatech, Osterrode, Deutschland

A.0.3 DNA-Messung

Versa Fluor Fluorometer, BioRad, München, Deutschland

Photometer, Dr. Lange GmbH, Berlin, Deutschland

A.0.4 Gel-Elektrophorese

Gelkammer: Horizon 58, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Power Supply für Gelkammer: ST 304, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA

A.0.5 PCR

Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland

A.1 Material

Aces 2.0 Human DNA Quantitation System, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragmente), Roche, Mannheim, Deutschland
BioMax Light, Kodak, Stuttgart, Deutschland
BST 98 I, Promega, Mannheim, Deutschland
CDP-Star, Roche, Mannheim, Deutschland
CSPD, Roche, Mannheim, Deutschland
Detection Buffer, „Dig Wash and Block Buffer Set“, Roche, Mannheim, Deutschland
Digoxigenin-markierte Sonden, MWG, Ebersberg, Deutschland
DIG Wash and Block Puffer Set, Roche, Mannheim, Deutschland
DNA-Extraktionskit: Super Quick Gene 1, Immucor, Roedermark, Deutschland
DNA, MB grade, Roche, Mannheim, Deutschland
DNA-Typing Grade K562 DNA, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Easy Pure DNA Purification Kit, Biozym, Hess.-Oldendorf, Deutschland
Entwickler: Röntgen Rapid, Tetenal, Norderstedt, Deutschland
Expand Long Template PCR System, Roche, Mannheim, Deutschland
Fixierer Hypam, Ilford, Dreieich, Deutschland
Lambda-DNA, Roche, Mannheim, Deutschland
LumiPhos Plus, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Min-R 2000, Kodak, Stuttgart, Deutschland
Maleinic Acid Buffer, „Dig Wash and Block Buffer Set“, Roche, Mannheim, Deutschland
Nylon Membran (positiv geladen), Roche, Mannheim, Deutschland
QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
PicoGreen dsDNA Quantification Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA
PVU II, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Washing Buffer, „Dig Wash and Block Buffer Set“, Roche, Mannheim, Deutschland

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7

Nukleolysepuffer: 0,01 M Tris, HCl pH 8,2; 0,1 M NaCl, 0,01 M EDTA

Prähybridisierungspuffer:

12,5 ml 20 x SSC

10 ml 10 x conc. Blockierungslsg.

0,5 ml 2% SDS

0,5 ml 10% N-Laurylsarcosin

auf 50 ml mit Aqua steril

Hybridisierungspuffer:

Prähybridisierungspuffer plus 5 pmol Hummit 1 pro Milliliter Puffer

Waschlösung 1 (2 x SSC+0,1% SDS):

5 ml 20 x SSC

2,5 ml 2% SDS

auf 50 ml mit Aqua steril

Waschlösung 2 (0,5 x SSC+0,1% SDS):

1,25 ml 20 x SSC

2,5 ml 2% SDS

auf 50 ml mit Aqua steril

Blockierungslösung:

4,5 ml 10 x conc. Maleinsäurepuffer

auf 45 ml mit Aqua steril

jetzt 5 ml 10 x conc. Blockierungsreagenzlösung.

Waschlösung 3:

5ml 10 x conc. Waschpuffer

auf 50 ml mit Aqua steril

Waschlösung 4:

5ml 10 x conc. Detektionspuffer

auf 50 ml mit Aqua steril

Denaturierungslösung:

0,5 M NaCl

0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung:

0,2 M Tris, pH 7,5

100 ml 20 x SSC

auf 1 L mit Aqua steril

Anhang B

Abkürzungsverzeichnis

DNA = Desoxyribonukleinsäure

mtDNA = mitochondriale Desoxyribonukleinsäure

PCR = Polymerasekettenreaktion

PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells

ATP = Adenosintriphosphat

NCBI = National Center of Biotechnology Information

D-Loop = Displacement-Loop

HVR 1+2 = Hypervariable Region 1 und 2 der Kontrollregion

EMBL = European Molecular Biology Laboratory

Dig = Digoxigenin

ncDNA = Kern-DNA

bp = Basenpaar(e)

dNTPs = Nukleotide

SSC = Natriumchlorid-Natriumcitrat

SDS = Dodecylsulfat Natriumsalz

Literaturverzeichnis

- [1] M. J. Absalon, C.O. Harding, D.R. Fain, L. Lei, and K.J. Mack. Leigh syndrome in an infant resulting from mitochondrial DNA depletion. *Pediat Neurol*, 24:60-63, 2001.
- [2] S.J. Ahn, J. Costa, and J.R. Emanuell. Picogreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pre- or post PCR. *Nucleic Acids Res*, 24:2623-2625, 1996.
- [3] A. Akane, H. Shiono, K. Matsubara, H. Nakamura, M. Hasegawa, and M. Kagawa. Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis. *J Forensic Sci*, 38:691-701, 1993.
- [4] B. Alberts. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo, 1999.
- [5] S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, and I.G. Young. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465, 1981.
- [6] R.M. Andrews, I. Kubacka, P.F. Chinnery, R.N. Lightowlers, D.M. Turnbull, and N. Howell. Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 23:147, 1999.
- [7] U. Arnason, A. Gullberg, and A. Janke. Molecular timing of primate divergences as estimated by two nonprimate calibration points. *J Mol Evol*, 47:718-727, 1998.
- [8] R.K. Bai, C.L. Perng, C.H. Hsu, and L.J.C.Wong. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann NY Acad Sci*, 1011:304-309, 2004.

- [9] R. Barazzoni, K.R. Short, and K. Sreekumaran Nair. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. *J Biol Chem*, 275:3343-3347, 2000.
- [10] A. Barrientos, J. Casademont, F. Cardellach, E. Ardite, X. Estivill, A. Urbano-Marquez, J.C. Fernandez-Checa, and V. Nunes. Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial-encoded genes in the human aging process. *Biochem Mol Med*, 62:165-171, 1997.
- [11] A. Barrientos, J. Casademont, F. Cardellach, X. Estivill, A. Urbano-Marquez, and V. Nunes. Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging. *Brain Res Mol Brain Res*, 52:284-289, 1997.
- [12] C. Barthelemy, H.O. de Baulny, J. Diaz, M.A. Cheval, P. Frachon, N. Romero, F. Goutieres, M. Fardeau, and A. Lombes. Late-onset mitochondrial DNA depletion: DNA copies number, multiple deletions and compensation. *Ann Neurol*, 49:607-617, 2001.
- [13] C.D. Berdannier and H.B. Everts. Mitochondrial DNA in aging and degenerative disease. *Mutat Res*, 475:169-183, 2001.
- [14] D. Bogenhagen and D.A. Clayton. The number of desoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa Cells. *J Biol Chem*, 249:7991-7995, 1974.
- [15] W.M. Brown, M.Jr. George, and A.C. Wilson. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:1967-1971, 1979.
- [16] J.E. Bryant, K.G. Hutchings, R.K. Moyzis, and J.K. Griffith. Measurement of telomeric DNA content in human tissues. *Biotechniques*, 23:476-482, 1997.

- [17] B. Budowle, W.R. Hudlow, S.B. Lee, and L. Klevan. Using a CCD camera imaging system as a recording device to quantify human DNA by slot blot hybridization. *Biotechniques*, 30:680-685, 2001.
- [18] N.A. Campbell. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2. Auflage, 1997. Heidelberg - Berlin - Oxford.
- [19] L. Cavellier, E.E. Jazin, I. Eriksson, J. Prince, U. Bave, L. Orelund, and U. Gyllensten. Decreased cytochrome-c oxidase activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics. *Genomics*, 29:217-224, 1995.
- [20] B. Chabi, B. Mousson de Camaret, H. Duborjal, J.P. Issartel, and G. Stepien. Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: application to diagnosis. *Clin Chem*, 49:1309-1317, 2003.
- [21] D.A. Clayton. Nuclear gene products that function in mitochondrial DNA replication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 317:473-482, 1987.
- [22] J.M. Cooper, V.M. Mann, and A.H. Schapira. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J Neurol Sci*, 113:91-98, 1992.
- [23] M. Corral-Debrinski, T. Horton, M.T. Lott, J.M. Shoffner, M.F. Beal, and D.C. Wallace. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet*, 2:324-329, 1992.
- [24] G.A. Cortopassi, D. Shibata, N.W. Soong, and N. Arnheim. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:7370-7374, 1992.

- [25] A.D.N.J. de Grey. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *BioEssays*, 19:161-166, 1997.
- [26] F. Diaz, M.P. Bayona-Bafaluy, M. Rana, M. Mora, H. Hao, and C.T. Moraes. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res*, 30:4626-4633, 2002.
- [27] C. Diez-Sanchez, E. Ruiz-Pesini, A.C. Lapena, J. Montoya, A. Perez-Martos, A. Enriquez, and M. Lopez-Perez. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 68:180-185, 2002.
- [28] THE DIG USER'S GUIDE FOR FILTER HYBRIDIZATION, Roche, Mannheim, Deutschland.
- [29] P. Fernandez-Silva, V. Petruzzella, F. Fracasso, M.N. Gadaleta, and P. Cantatore. Reduced synthesis of mtRNA in isolated mitochondria of senescent rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 176:645-653, 1991.
- [30] F. Fridez and S. Rochat asnd R. Coquoz. Individual identification of cats and dogs using mitochndrial DNA tandem repeats? *Sci Justice*, 39:167-171, 1999.
- [31] [www.fnz.med.tu-dresden.de/FNZ Diagnostik/Diagnostik/Genetische Analytik.htm](http://www.fnz.med.tu-dresden.de/FNZ_Diagnostik/Diagnostik/Genetische_Analytik.htm).
- [32] [www.fnz.med.tu-dresden.de/FNZ Diagnostik/Steuerseite.htm](http://www.fnz.med.tu-dresden.de/FNZ_Diagnostik/Steuerseite.htm).
- [33] D. Gershon. The mitochondrial theory of aging: is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? *Exp Gerontol*, 34:613-619, 1999.

- [34] P. Gill, P.L. Ivanov, C. Kimpton, R. Piercy, N. Benson, G. Tully, I. Evett, E. Hagelberg, and K. Sullivan. Identification of the remains of the romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*, 6:130-135, 1994.
- [35] P. Gill, C. Kimpton, R. Aliston-Greiner, K. Sullivan, M. Stoneking, T. Melton, J. Nott, S. Barritt, R. Roby, and M. Holland. Establishing the identity of Anna Anderson Manahan. *Nat Genet*, 9:9-10, 1995.
- [36] E. Hagelberg. Ancient and modern mitochondrial DNA sequences and the colonization of the Pacific. *Electrophoresis*, 18:1529-1533, 1997.
- [37] M. Hayakawa, K. Katsumata, M. Yoneda, M. Tanaka, S. Sugiyama, and T. Ozawa. Agerelated extensive fragmentation of mitochondrial DNA into minicircles. *Biochem Biophys Res Commun*, 226:369-377, 1996.
- [38] K. Herholz, E. Salmon, D. Perani, J.C. Baron, V. Holthoff, L. Fröhlich, P. Schönknecht, K. Ito, R. Mielke, E. Kalbe, G. Zündorf, X. Delbeuck, O. Pelati, D. Anchisi, F. Fazio, N. Kerrouche, B. Desgranges, F. Eustache, B. Beuthien-Baumann, C. Menzel, J. Schröder, T. Kato, Y. Arahata, M. Henze, and W.D. Heiss. Discrimination between alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *Neuroimage*, 17:302-316, 2002.
- [39] R. Higuchi, C.H. v. Beroldingen, G.F. Sensabaugh, and H.A. Erlich. DNA typing from single hairs. *Nature*, 332:543-546, 1988.
- [40] M.M. Holland, D.L. Fischer, L.G. Mitchell, W.C. Rodriguez, J.J. Canik, C.R. Merrill, and V.W. Weedn. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the vietnam war. *J Forensic Sci*, 38:542-553, 1993.
- [41] <http://www.hybridmedicalanimation.com>.

- [42] E. Jehaes, R. Decorte, A. Peneau, J.H. Petrie, P.A. Boiry, A. Gilissen, J.P. Moissan, H. Van den Berghe, O. Pascal, and J.J. Cassiman. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet*, 6:383-395, 1998.
- [43] N. Kamimura, S. Ishii, M. Liandong, and J.W. Shay. Three separate mitochondrial DNA sequences are contiguous in human genomic DNA. *J Mol Biol*, 210:703-707, 1989.
- [44] S. Ketzler. Quantitative Cytoarchitektonik der menschlichen Hirnrinde bei AIDS: eine stereologische Untersuchung von Neuronen und Glia in der Area 11. *Diss. Universität zu Lübeck*, 1989.
- [45] H. Kiltgaard, M. Mantoni, S. Schiaffino, S. Ausoni, L. Gorza, C. Laurent-Winter, P. Schnohr, and B. Saltin. Function, morphology and protein expression of aging skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men with different training backgrounds. *Acta Physiol Scand*, 140:41-54, 1990.
- [46] R. Knippers. *Molekulare Genetik*. 8. Auflage, Thieme Stuttgart 2001.
- [47] J. Koolman and K.H. Röhm. *Taschenatlas der Biochemie*. 1. Auflage, Thieme Stuttgart, 1994.
- [48] S.A. Kovalenko, G. Kopsidasm J.M. Kelso, and A.W. Linnane. Deltoid human muscle mtDNA is extensively rearranged in old age subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 232:147-152, 1997.
- [49] A. Kowald. The mitochondrial theory of aging: do damaged mitochondria accumulate by delayed degradation? *Exp Gerontol*, 34:605-612, 1999.
- [50] M. Krings, A. Stone, R.W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, and S. Pääbo. Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90:19-30, 1997.

- [51] D.M. Kube and A. Srivastava. Quantitative DNA slot blot analysis: inhibition of DNA binding to membranes by magnesium ions. *Nucleic Acids Res*, 25:3375-3376, 1997.
- [52] W. Lange. Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tiss Res*, 157:115-124, 1975.
- [53] H.C. Lee, C. Ladd, M.T. Bourke, and F. Tirnady E. Pagliaro. DNA typing in forensic science. *Am J Forensic Med Pathol*, 15:269-282, 1994.
- [54] H.C. Lee, C.Y. Lu, H.J. Fahn, and Y.H. Wei. Aging- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett*, 441:292-296, 1998.
- [55] H.C. Lee, P.H. Yin, C.Y. Lu, C.W. Chi, and Y.H. Wei. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J*, 348:425-432, 2000.
- [56] V.W.S. Liu, C. Zhang, and P. Nagley. Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during aging. *Nucleic Acids Res*, 26:1268-1275, 1998.
- [57] H. Lodish. *Molekulare Zellbiologie*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2001.
- [58] A. Loessner, A. Alavi, K.U. Lewndrowski, D. Mozley, E. Souder, and R.E. Gur. Regional cerebral function determined by FDG-PET in healthy volunteers: normal patterns and changes with age. *J Nucl Med*, 36:1141-1149, 1995.
- [59] F. Lottspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin, 1998.

- [60] C. Meissner, T. Schwark, N. von Wurmb, and M. Oehmichen. Cerebellar mitochondrial DNA deletion associated with survival of prolonged ischemia. M. Oehmichen, (Ed.). *Brain hypoxia and ischemia. Research in Legal Medicine* 24, Schmidt-Römhild, Lübeck, 2000.
- [61] C. Meissner and N. von Wurmb. Sensitive detection of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA of young individuals. *Biotechniques*, 25:652-654, 1998.
- [62] C. Meissner, N. von Wurmb, B. Schimansky, and M. Oehmichen. Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle. *Forensic Sci Int*, 105:115-124, 1999.
- [63] S. Melov, J.M. Shoffner, A. Kaufman, and D.C. Wallace. Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res*, 23:4122-4126, 1995.
- [64] S. Meyer, G. Weiss, and A. v. Haeseler. Pattern of nucleotide substitution rate and heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics*, 152:1103-1110, 1999.
- [65] F.J. Miller, F.L. Rosenfeldt, C. Zhang, A.W. Linnane, and P. Nagley. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res*, 31:e61, 2003.
- [66] M.C. Brandon, M.T. Lott, K.C. Nguyen, S. Spolim, S.B. Navathe, P. Baldi, & D.C. Wallace, MITOMAP: a human mitochondrial genome database. 2004 update. *Nucleic Acids Research* 33 (Database Issue):D611-613, 2005. URL: <http://www.mitomap.org>.

- [67] J.R. Moeller, T. Ishikawa, V. Dhawan, F. Spetsieris, F. Mandel, G.E. Alexander, C. Grady, P. Pietrini, and D. Eidelberg. The metabolic topography of normal aging. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16:385-398, 1996.
- [68] C.T. Moraes. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet*, 17:199-205, 2001.
- [69] C.T. Moraes, L. Kenyon, and H. Hao. Mechanisms of human mitochondrial DNA maintenance: the determining role of primary sequence and length over function. *Mol Biol Cell*, 10:3345-3356, 1999.
- [70] P.D. Mozley, A.M. Sadek, A. Alavi, R.C. Gur, L.R Muenz, B.J. Bunow, H.J. Kim, M.H. Stecker, P. Jolles, and A. Newberg. Effects of aging on the cerebral distribution of technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime in healthy humans. *Eur J Med*, 24:754-761, 1997.
- [71] C. Muelhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2002.
- [72] M.M. Nass. Mitochondrial DNA: advances, problems, and goals. *Science*, 165:25-35, 1969.
- [73] T. Ozawa, M. Tanaka, S. Ikebe, K. Ohno, T. Kondo, and Y. Mizuno. Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in parkinsonian striatum by kinetic PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 172:483-489, 1990.
- [74] G. Pesole, C. Gissi, A. De Chirico, and C. Saccone. Nukleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol*, 48:427-434, 1999.
- [75] M.C. Petit-Taboe, B. Landeau, J.F. Desson, B. Desgranges, and J.C. Baron. Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. *Neuroimage*, 7:176-184, 1998.

- [76] P. Reiss, M. Casula, A. de Ronde, G.J. Weverling, J. Goudsmit, and J.M.A. Lange. Greater and more rapid depletion of mitochondrial DNA in blood of patients treated with dual (zidovudine + didanosine or zidovudine + zalcitabine) versus single (zidovudine) nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *HIV Med*, 5:11-14, 2004.
- [77] A.M. Remes, I.E. Hassinen, M.J. Ikaheimo, R. Herva, J. Hirvonen, and K.J. Peuhkurinen. Mitochondrial DNA deletions in dilated cardiomyopathy: a clinical study employing endomyocardial sampling. *J Am Coll Cardiol*, 23:935-942, 1994.
- [78] A. Riggin, V.T. Luu, J.K. Lobdell, and M.K. Wind. A non-isotopic probe-hybridization assay for residual DNA in biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*, 16:561-572, 1997.
- [79] E.D. Robin and R. Wong. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol*, 136:507-513, 1988.
- [80] G. Rödel. Mutations of the mitochondrial genome. Diagnosis and pathogenetic significance. *Pathologe*, 15:315-320, 1994.
- [81] P.K. Rogan and J.J. Salvo. Molecular genetics of pre-columbian south american mummies. *Yearb Phys Anthropol*, 33:195-214, 1990.
- [82] Steve Rozen and Helen J. Skaletsky. Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000.
- [83] K.F. Schröder, A. Hopf, H. Lange, and G. Thörner. Morphometrisch-statistische Strukturanalysen des Striatum, Pallidum und Nucleus subthalamicus beim Menschen. *J Hirnforsch*, 16:333-350, 1975.

- [84] R.A. Sodmann. Quantifikation der humanen mitochondrialen DNA mittels Slot-Blot-Hybridisierung. *Dissertation Universität Giessen*, 1998.
- [85] N.W. Soong, D.R. Hinton, G. Cortopassi, and N. Arnheim. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat Genet*, 2:318-323, 1992.
- [86] H. Suzuki, T. Kumagai, A. Goto, and T. Saguira. Increase in intracellular hydrogen peroxide and the upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 249:542-545, 1998.
- [87] J.W. Taanman. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, 1410:103-123, 1999.
- [88] Y. Tang, G. Manfredi, M. Hirano, and E.A. Schon. Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long-term cultured transmitochondrial cell lines. *Mol Biol Cell*, 11:2349-2358, 2000.
- [89] N.D. Volkow, J. Logan, J.S. Fowler, G.J. Wang, R.C. Gur, C. Wong, C. Felder, S.J. Gatley, Y.S. Ding, R. Hitzemann, and N. Pappas. Association between age-related decline in brain dopamine activity and impairment in frontal and cingulated metabolism. *Am J Psychiatry*, 157:75-80, 2000.
- [90] D.C. Wallace, M.T. Lott, M.D. Brown, K. Huoponen, and A. Torroni. Adapted from the original print report: Report of the committee on human mitochondrial DNA. in cuticchia a.j. (ed) human gene mapping 1995: a compendium. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 910-954, www.gen.emory.edu/MITOMAP/report.html, 1995.

- [91] C.T. Yeh, W.C. Shyu, I.S. Sheen, C.M. Chu, and Y.F. Liaw. Quantitative assessment of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction and a digoxigenin detection system: comparison with branched DNA assay. *J Virol Methods*, 65:219-226, 1997.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir im Laufe der Arbeit geholfen haben.

Besonderer Dank geht an meine Betreuer PD Dr. med. C. Meissner und Dr. rer. nat. S. Mohammed sowie an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. M. Oehmichen für eine freundliche und kompetente Betreuung während der gesamten Arbeit.

Dank auch an Frau Dipl.-Biol. P. Bruse und Dr. rer. nat. L. Komorowski für die gute Zusammenarbeit und die stets nette Hilfe mit den nie endenden Laborproblemen.

Des Weiteren danke ich Herrn Steingröver, Dr. rer. nat. C. Roos ("Gene Bank of Primates", Ludwig-Maximilians-Universität München), Prof. Dr. med. W. Solbach, Frau Dipl.-Inf. C. Gemünd („Sequence Analyzing Service", EMBL-Institut, Heidelberg), Dr. med. vet. R. Noël (Veterinärmediziner, Universität zu Lübeck), Dr. rer. nat. A. Reiter (Institut für Rechtsmedizin, Universität zu Lübeck) sowie zahlreichen anderen Wissenschaftlern der Universität zu Lübeck.

Meinen beiden Brüdern Dr. Jan-Michael und Peter danke ich besonders für ihre Hilfe beim Layout. Meinen Eltern möchte ich ausdrücklich dafür danken, dass sie mich moralisch und vor allem finanziell unterstützt haben.

Lebenslauf

Personendaten



Name: Thomas Frahm

Geburtsdatum: 04. April 1975

Geburtsort: Rostock

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Dipl. med. Renate Frahm,
Dr. med. Hans-Dieter Frahm

Familienstand: ledig

Schulausbildung

1981 – 1989 Polytechnische Oberschule, Rostock

1989 – 1996 Gymnasium, Abschluss mit Abitur an der Lauenburgischen
Gelehrtenschule, Ratzeburg

1992 – 1993 Gastschüler an der Quachita Parish Highschool, Monroe, Louisiana,
USA

Universitätsausbildung

1997 – 2004 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck, Abschluss
mit dem dritten Staatsexamen, Approbation als Arzt

1999 Promotion im Institut für Rechtsmedizin, Universität
zu Lübeck

-
- | | |
|------|--|
| 2002 | Famulatur, Dartmouth-Hitchcock Medical Center,
Hanover, NH, USA |
| 2004 | Tätigkeit als Arzt im Praktikum am Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Hygiene, Universität zu Lübeck |
| 2004 | Beginn der Facharztausbildung am Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck |

Sonstiges

- | | |
|-------------|--|
| 1996 | 3. Platz beim Landeswettbewerb „Jugend forscht“ Schleswig-Holstein im
Fachbereich Biologie und Sonderpreis „Förderungswürdige Arbeit“ |
| 1996 | Praktikum am Max-Planck-Institut für Limnologie, Plön |
| 1996 – 1997 | Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Kreis-Herzogtum Lauenburg |