Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur H.-J. Kaatsch

Die semiquantitative Bestimmung der Akkumulation der 4977bp-Deletion des mitochondrialen Genoms in verschiedenen Arealen des menschlichen Gehirns

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Anja Schulz (geb. Gehlsen – Lorenzen)
aus Rendsburg

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Meißner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer.nat. Georg Sczakiel

Tag der mündlichen Prüfung: **03.04.09**

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den **03.04.09**

Gez. Prof. Dr. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS (Seite)

1. EINLEITUNG

1.1 Das Mitochondrium 4

1.2 Das mitochondriale Genom 5

1.3 Die Atmungskette 6

1.4 Freie Radikale und oxidativer Stress 8

1.5 Die Entstehung der 4977bp-Deletion 10

1.6 Krankheiten aufgrund mitochondrialer Defekte 14

1.7 Einfluss des oxidativen Stress auf mtDNA und die Alterungstheorie 15

1.8 ZIEL der ARBEIT 17

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Extraktion der Gesamt-DNA aus Hirngewebe 18
2.1.1 Probenmaterial

2.2 Quantifizierung der extrahierten DNA 19
2.2.1 Photometrische Bestimmung
2.2.2 Slotblot

2.3 Amplifizierung der DNA 21
2.3.1 PCR- Ansatz und Ablauf
2.3.2 Verwendete *Primer*

2.4 Detektion der Fragmente 25
2.4.1 Auftrennung und Detektion der Amplifikate auf Polyacrylamidgelen
2.4.2 Detektion der Fragmente im ABI PRISM ™ 310 Genetic Analyzer

2.5 Statistik und Auswertungsprogramme 29

3. ERGEBNISSE

3.1 Quantität und Qualität der DNA 30

3.2 Auswertung der Polyacrylamidgele 31

3.3 Quantifizierung der 4977bp-Deletion der mtDNA mittels des ABI PRISM ™ 310 Genetic Analyzers 32
3.3.1 Prinzip der Detektion
3.3.2 Auswertung

3.4 Auswertung der verschiedenen Hirnabschnitte 35

3.5 Altersabhängigkeit der Akkumulation der 4977bp-Deletion bei akut zu Tode gekommenen Patienten 41

4. DISKUSSION

4.1 Überprüfung der Methode 42
4.1.1 Gewebeauswahl
4.1.2 Optimierung der PCR
4.1.3 Semiquantitative Auswertung
4.1.4 Andere Quantifizierungsmethoden

4.2 Intraindividuelle Unterschiede in den verschiedenen untersuchten Hirnabschnitten und dem Skelettmuskel 46
4.2.1 Anatomie und Physiologie der verschiedenen Hirnareale
4.2.2 Intraindividuelle Unterschiede
4.2.3 Andere Indikatoren für oxidative Schäden
4.2.4 Vergleich mit Muskelgewebe

4.3 Die Altersabhängigkeit der 4977bp-Deletion 49
4.3.1 Alterabhängige Akkumulation
4.3.2 Alterungstheorien

4.4 Der Zusammenhang der 4977bp-Deletion mit Hypoxie 55
4.4.1 Pathophysiologische Folgen chronischer Hypoxie
4.4.2 Vermehrte Akkumulation der 4977bp-Deletion im Kleinhirn bei chronischer Hypoxie
4.4.3 Pathophysiologische Veränderungen in anderen Geweben
4.4.4 Apoptose

4.5 Der Zusammenhang der 4977bp-Deletion mit Neurodegeneration 59
4.5.1 Mitochondriale Encephalomyopathien
4.5.2 Neurodegenerative Erkrankungen allgemein
4.5.3 Intrazelluläre Schutzmechanismen und Therapieoptionen

4.6 Die Erfassung der Akkumulation der 4977bp-Deletion und ihre Bedeutung in der Rechtsmedizin 62

4.7 Ausblick 63

5. ZUSAMMENFASSUNG 65

6. ANHANG

6.1 Tabellen der Messwerte 66

6.2 Abkürzungsverzeichnis 68

6.3 Verwendete Chemikalien 69

6.4 Verwendete Enzyme 69

6.5 Verwendete Geräte 70

6.6 Verwendete Lösungsansätze 71

LITERATUR 72

DANKSAGUNG 82

LEBENSLAUF 83

1. EINLEITUNG

1.1 Das Mitochondrium

Der Begriff Mitochondrium wurde 1898 zum ersten Mal von Benda (1902) geprägt. Das aus dem Griechischen stammende *Mitos* steht für Kern, *Chondros* für Faden. Mitte des letzten Jahunderts wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen die Feinstruktur geklärt. In Zeitrafferaufnahmen wurden die Beweglichkeit und die Fähigkeit der Mitochondrien zur Gestaltänderung, von oval-sphärisch bis zu langgestreckten und verzweigten Systemen dokumentiert.

Mitochondrien sind etwa 1-5 µm große ovale und lipoidreiche Zellorganellen nahezu aller Eukaryonten, die von einer Doppelmembran umschlossen sind und einen großen Teil des cytoplasmatischen Volumens einnehmen (Alberts et al., 1995) (s. **Abb**. 1 u. 2).

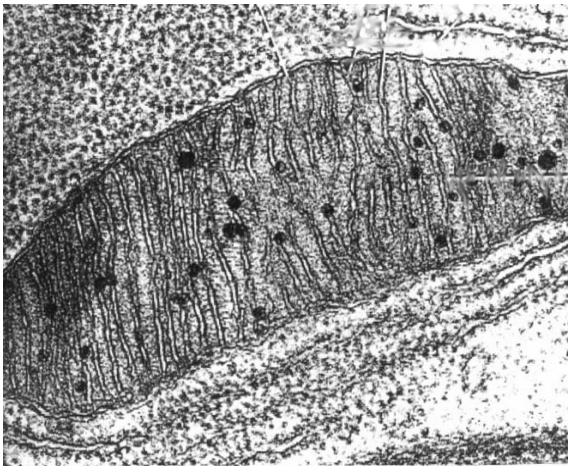


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums (Pankreas) aus Alberts et al. (1995)

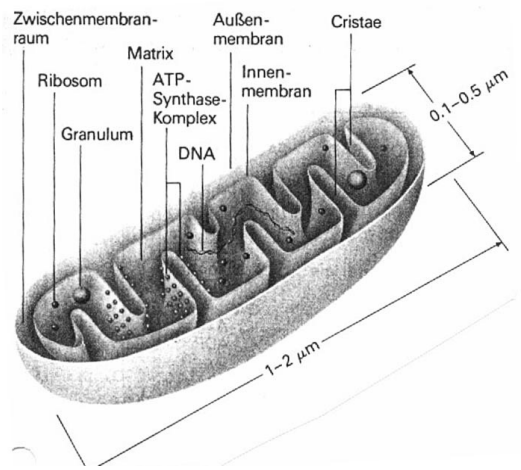


Abb. 2: 3-D Darstellung im Längsschnitt, in der Matrix mtDNA und Ribosomen. Alberts (1995)

Die äußere Membran besteht jeweils ca. zur Hälfte aus Lipiden und Proteinen. Durch ihre Porine ist sie für Moleküle bis 10 kD Gewicht durchlässig.

Die innere Membran enthält etwa 80 % Proteine und 20% Lipoproteine, ist zur Oberflächenvergrößerung kammähnlich (Cristae-Typ) oder röhrenförmig (Tubuli-Typ) eingefaltet und umschließt die Matrix (Alberts et al., 1995). In der Innenmembran der Mitochondrien und der Matrix sind die für die biochemischen Reaktionen benötigten Enzyme enthalten. Sie sind meist in der Nähe von Energiequellen (z.B. Fettvakuolen) oder bei ATP-abhängigen Zellstrukturen lokalisiert und enthalten die zentralen Enzyme

der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung, des Zitronensäurezyklus und der β-Oxidation der Fettsäuren (Alberts, 1995).

Der größte Teil der aerob lebenden Zellen, die den Sauerstoff nicht durch Photosynthese generieren können, benötigt ausreichende Energie für Stoffwechselaktivitäten und ebenfalls ein genügendes Angebot an Sauerstoff. Mitochondrien haben als Hauptaufgabe die Energiegewinnung durch Oxidation der verschiedenen Nährstoffe in der Zelle, wobei zugleich Rohstoffe für die Biosynthese anfallen. Die frei werdende Energie wird zur Bildung von ATP verwendet.

Je nach Zelle und Gewebe schwankt die Anzahl der Mitochondrien. Menschliche Oozyten haben mehr als hunderttausend, Spermatozoen ca. 50, einige Protozoen nur ein einziges Mitochondrium (Lodish, 1996).

Mitochondrien entstehen nie durch *de novo* Synthese, sondern durch Wachstum und Teilung bereits vorhandener Organellen. Diese erfolgt meist in der Interphase der Zellteilung. Dieser Vorgang ist so geregelt, dass sich die Anzahl der Mitochondrien pro Zellzyklus (auch im postmitotischen Gewebe) etwa verdoppelt. Während der Teilung werden diese dann gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt (Robin & Wong, 1988).

Die Fähigkeit zur bedingten Selbstreplikation deutet daraufhin, dass sich die Mitochondrien evolutionär von intrazellulären Symbionten ableiten, die als Eubakterien endosymbiontisch in primitiven Wirtszellen lebten. Für diese Hypothese sprechen ebenfalls die Prokaryonten-typischen Cardiolipidmengen, die histonfreie DNA und die rRNA –Sequenzübereinstimmung (O'Brien et al., 1990, Chan, 2006).

Man kann Mitochondrien als semiautonom bezeichnen, denn die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine für Transkription, Translation und Replikation werden vom Zellkern kodiert und in die Mitochondrien transportiert. Ohne diese Proteine sind Mitochondrien weder replikations- noch funktionsfähig (Rödel, 1994).

1.2 Das mitochondriale Genom

Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten zeigen, dass es sich bei humaner mitochondrialer DNA (mtDNA) um ein doppelsträngiges, ringförmig geschlossenes Molekül handelt, bestehend aus 16.569 Nukleotiden mit einem Molekulargewicht von etwa 50.000 kD (Wallace et al., 1999).

Das Genom humaner Mitochondrien ist durch äußerste Ökonomie gekennzeichnet, da zwischen den einzelnen Genen kaum nicht-kodierende Basen (Introns) vorhanden sind. Diese nicht-kodierenden Bereiche umfassen insgesamt ca. 1200 bp und beinhalten die

beiden Transkriptionsstart-Sequenzen, einen Replikationsstart, sowie die D *(displacemant)* – Loop – Region, die in über 150 Sequenzpolymorphismen vorliegen kann (Lutz et al., 1996; Ballard & Dean, 2001).

Die beiden komplementären Stränge der mtDNA unterscheiden sich in ihrer Basen-Zusammensetzung, dadurch ergeben sich unterschiedliche Sedimentations-Geschwindigkeiten in der denaturierenden Dichtegradientenzentrifugation. Der Strang mit der höheren Sedimentationsgeschwindigkeit, der sogenannte H (*Heavy*)-Strang enthält viele Desoxyguaninnukleotide, während der L (*Light*)-Strang viele Desoxycytosinnukleotide aufweist. Jeder Strang hat einen eigenen Replikationsursprung (*origin*) O_H und O_L (Clayton, 1992; Lenaz et al., 2006).

Die Replikation der mtDNA erfolgt unabhängig vom Zellzyklus. Die mitochondriale DNA repliziert sich auch in postmitotischem Gewebe, das selbst teilungsunfähig ist. Jedes Mitochondrium enthält ca. 2-10 Moleküle mitochondrialer DNA (Robin, 1988), in einer Zelle befinden sich durchschnittlich 1000 bis 10000 Kopien der mtDNA. Dennoch beträgt der Anteil der mtDNA an der gesamten Zell-DNA weniger als 1 % (Müller-Höcker, 1994).

MtDNA wird maternal vererbt, da bei der Befruchtung einer Eizelle vom Spermium nahezu ausschließlich nukleäre DNA in die Eizelle gelangt. Während der embryonalen Entwicklung werden die Mitochondrien nach dem Zufallsprinzip auf die Tochterzellen verteilt. Die Zygote kann nach einer Mutation der eigenen mtDNA eine Mischung aus mutierten und normalen Molekülen enthalten (Heteroplasmie). Mit den weiteren Teilungen könnendie Tochterzellen wieder zufällig zu vollständig normalen oder anderseits zu vollständig mutierten mtDNA-Trägern „driften“. Dies wird als replikative Segregation bezeichnet (Giles et al., 1980).

1.3 Die Atmungskette

Alle Sauerstoff atmenden Zellen nutzen die Oxidation von an koenzymgebundenem Wasserstoff durch Luftsauerstoff zu Wasser als wichtigste energieliefernde Reaktion. Diese Reaktion steht unter aeroben Bedingungen mit dem energieliefernden Abbau von Kohlenhydraten, Glycogen, Fetten etc. in einem ständigen Fließgleichgewicht. Die biologische Oxidation ist unter den im lebenden Organismus herrschenden physikalischen Bedingungen irreversibel.

Die zentrale Stellung im oxidativen Stoffwechsel nehmen jedoch die Mitochondrien ein, welche als Katalysatoren der Zellatmung, quasi als „Kraftwerke der Zelle“ anzusehen

sind. Wie in **Abb**. 3 dargestellt findet hier die sogenannte Endoxidation der Substrate des Energiestoffwechsels in einem in der inneren Zellmembran lokalisierten Multi-Enzym-System statt. Die dort hintereinander geschalteten Redoxsysteme werden katalysiert und durch Protonen- und Elektronenübertragung wird Wasserstoff aus z.B. Kohlenhydraten zu Wasser und Kohlenstoff zu CO_2 oxidiert. Die dabei freiwerdende Energie wird zur Bildung von ATP aus ADP und Phosphat genutzt, ein kleiner Teil geht als Wärme verloren.

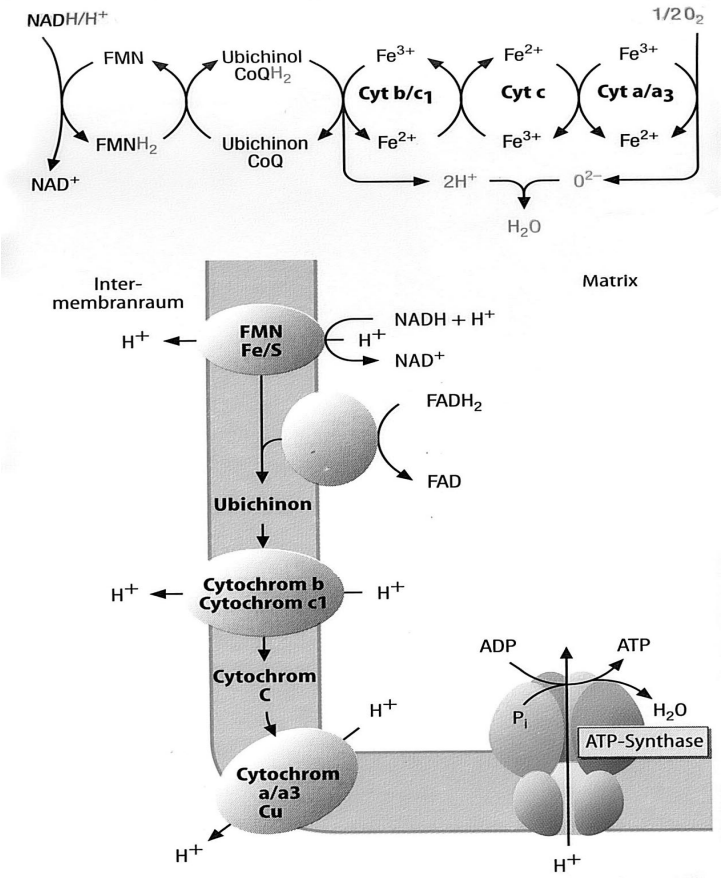


Abb.3: Komplexe in der Membran im Verhältnis : 0,3 :1:1:1 : (Ubichinon = Coenzym Q10)
Komplex I : NADH: Ubichinon- Oxidoreduktase, Komplex II : Succinat: Ubichinon- Oxidoreduktase, Komplex III : Dihydro- Ubichinon: Cytochrom C- Oxidoreduktase, Cytochrom bei bc1, Komplex IV : Cytochrom C- Oxidase, terminale Oxidase, Warburg'sches Atmungsferment
(„Komplex V" : ATP- Synthetase miteinander assoziierte F0-(H+ Transport) und F1-(ADP+P=ATP) Untereinheiten)

Wasserstoff tritt in Form von NADH, welches z.B. im Zitronensäurezyklus der Glykolyse entsteht, in die Reaktion ein. In einer Serie von aufeinanderfolgenden Redoxvorgängen werden die NADH-gebundenen Elektronen schließlich auf den Akzeptor Sauerstoff übertragen (Skulachev, 2006).

Gleichzeitig mit dem Elektronentransport werden in den Atmungskettenkomplexen I, III und IV Protonen aus dem Matrixraum durch die innere Membran nach außen gepumpt. Dadurch entstehen ein pH-Gradient und ein elektrisches (innen negatives) Membranpotential (200 mV). Da die innere Membran für Protonen undurchlässig ist, entsteht praktisch so der „Antrieb“ für die mitochondriale ATP- Synthese, bzw. Umkehr der Hydrolyse an der reversibel funktionierenden ATPase (Komplex V) (P. Mitchell, 1961: „chemieosmotische Theorie“ und 1979 (Nobel-Vortrag)). Mit Ausnahme der Untereinheiten des Komplexes II werden die meisten Proteine der Atmungskette sowohl aus Proteinen von nukleären als auch aus mitochondrial codierten Genen aufgebaut. (Pfanner et al., 1992; Janssen et al., 2006).

Wegen der zuvor beschriebenen mechanistischen und kinetischen Kopplung von ADP-Phosphorylierung und den Reaktionen der Atmungskette spricht man von der **oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS),** die nur bei ausreichendem Sauerstoff- und NADH- Angebot und dem richtigen ADP/ATP Verhältnis maximal effizient arbeiten kann.

1.4 Freie Radikale und oxidativer Stress

Radikale sind Atome oder Moleküle, die in ihrer Außenschale ungepaarte Elektronen aufweisen. Sie können organische Moleküle wie Ubichinone oder anorganische wie $O_2^{-}\cdot$ oder OH^{-} sein. Die Radikale des Sauerstoffs sind sehr reaktiv, zusammengefasst mit anderen reaktiven Substanzen werden sie als „Reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) oder Prooxidantien bezeichnet. Die hohe Reaktivität der ROS lässt sich aus der kurzen Halbwert ihres Zerfalls abschätzen, z.B. Superoxid/ $O_2\cdot$: 1 µs (37 °C), Hydroxyl/ $OH\cdot$: 1/1000 µs, Stickstoffoxid/ $NO\cdot$: 4 - 5 s etc..

Diese Substanzen sind Produkte des normalen Metabolismus einer Zelle, da Sauerstoff durch Übertragung eines Elektrons, unter anderem über die Atmungskette, in das Superoxid-Radikal umgewandelt werden kann. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht sowohl aus endo- als auch aus exogenen Quellen, durch Elektronenübertragung verschiedener Oxidasen bzw. durch Dismutation von $O_2\cdot$ mit Hilfe des Enzyms Superoxiddismutase in Anwesenheit von Protonen. H_2O_2 ist nicht reaktiv genug, um die organischen Moleküle seiner Umgebung zu oxidieren, hat aber die Fähigkeit durch hydrophobe Membranen zu diffundieren und mit reduzierten Eisen mittels Fenton- und Haber-Weiß Reaktion das hochreaktive Hydroxylradikal zu generieren. Mitochondrien weisen aber auch bei normaler Stoffwechselaktivität eine „Elektronenleckage“ auf.

Während früher davon ausgegangen wurde, dass bis zu 5% des Sauerstoffs in das Superoxidradikal konvertiert werden, schätzen aktuellere Experimente die ROS-Produktion auf weniger als 0,2 % des gesamten Elektronentransports vom NADH zum Sauerstoff. Somit ist die Bildung von freien Radikalen geringer als zuvor angenommen (Richter, 1995; St-Pierre et a., 2002; Meissner, 2007).

Andere Quellen von ROS stellen Enzyme, die Sauerstoff verarbeiten, wie z.B. Oxidasen dar. Im Immunsystem entstehen größere Mengen von Superoxiden durch die Kombination des NADPH-Oxidase-Systems und der phagozytierenden Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, als Teil der Eliminierung fremder Organismen, wobei der Organismus physiologisch ROS benutzt, um Bakterien im sogenannten „respiratory burst" abzutöten (Woodman et al., 1991).

Außerdem entstehen Superoxidanionradikale und Wasserstoffperoxid durch die Aktivität von sauerstoffverarbeitenden Enzymen wie Xanthin-Oxidase, bei der Entgiftung toxischer Substanzen durch das Cytochrom p450-System und der peroxisomalen Oxidation von Fett und Aminosäuren (Ames et al., 1999). ROS können grundsätzlich auch exogen entstehen, wie durch UV-, Hitze- und Röntgenstrahlung oder Schwermetalle (Berneburg et al., 1999, Prithivirajsingh et al., 2004).

Eine Verschiebung der Gleichgewichtslage zwischen Pro- und Anti-Oxidantien zugunsten der Prooxidantien wird als **„Oxidativer Stress"** bezeichnet. ROS können im Prinzip mit allen zellulären Strukturen reagieren. Wenn ein freies Radikal ein Nicht-Radikal trifft, kann eine Kettereaktion von freien Radikalen entstehen, wobei ständig neue Radikale gebildet werden (Halliwell, 2006).

Durch die hohe Reaktivität der ROS, vor allem des Hydroxylradikals und des Singulett-Sauerstoffs, werden Makromoleküle angegriffen und können so Lipide, DNA, Kohlenhydrate und Proteine schädigen. So kann in der sogenannten Lipidperoxidation das Wasserstoffatom am C-Atom der Doppelbindungen ungesättigter Lipide durch ROS oxidiert werden. Das entstehende Peroxyradikal kann einen neuen Schritt der Lipidperoxidation initiieren und damit die Kettenreaktion hervorrufen. Durch diese Reaktion kann die Struktur der Zellmembran modifiziert werden und sich die Aktivität der membrangebundenen Enzyme (z.B. die der Atmungskette) und die Zellpermeabilität ändern (Yakes & van Houten, 1997).

Außerdem können Proteine durch die toxische Wirkung der ROS denaturiert und fragmentiert werden, sowie Enzyme ihre Aktivität verlieren.

Die Schäden durch ROS an der DNA lassen sich in Strangbrüche und Basenmodifikationen unterteilen. Die modifizierten Basen, wie 8-Hydroxyguanin, 5-Hydroxymethyluracil und Thyminglykol können durch den Angriff der Hydroxylradikale, die an den 3'- oder 4'-C-Atomen der Desoxyribose angreifen, entstehen. Gerade das 8-hydroxy-Desoxyguanosin (8-OH-dG) kann als Marker für die oxidative Schädigung dienen, da es in der unbeschädigten DNA ausschließlich als Desoxyguanosin vorliegt (Richter, 1995; Yakes, 1997).

Aufgrund der Halbwertszeit von Tagen bis Monaten der mtDNA kann oxidativ geschädigte DNA akkumulieren und ist zudem wegen der weniger effizienten Korrektur- und Reparatursysteme gefährdeter als die nukleäre DNA (Mecocci et al., 1994).

Durch Oxidantien oder durch Stimulatoren des zellulären oxidativen Metabolismus kann die Apoptose, der „programmierte" Zelltod, induziert werden (Ghibelli et al., 1995).

Oxidative Schädigung der mitochondrialen Innenmembran verursacht eine Permeabilitätsveränderung. Diese hat das Austreten von Cytochrom C, einem Apoptose-induzierenden Faktor, zur Folge. Es kann aber auch zum unkontrollierten Zelltod führen (Ozawa, 1999). Viele Inhibitoren der Apoptose agieren in umgekehrter Weise antioxidativ oder sie erhöhen die antioxidative Schutzsysteme (Buttke, 1994). Um die toxische Wirkung der ROS zu vermeiden, entwickelte die aerobe Zelle ein „Radikal-Abwehrsystem" (Antioxidantien). Abwehrsysteme können aus Enzymen wie Katalasen, Peroxidasen und Superoxiddismutasen oder nichtenzymatischen Antioxidantien bestehen. Katalasen und Peroxidasen katalysieren die Dismutation von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Superoxiddismutasen katalysieren den Zerfall des hoch reaktiven Superoxidradikals in H_2O_2 und O_2 (Wiesner et al., 2006).

1.5 Die Entstehung der 4977bp-Deletion

Deletion bedeutet den Verlust eines interstitiellen Chromosomen- bzw. DNA-Abschnittes. Dies unterscheidet sie von anderen Veränderungen in der DNA wie Transition, Transversion, Insertion etc.

Je nach Ausmaß der Deletion (punktuell, numerisch oder strukturell) kann dies eine Abweichung des Phänotyps bewirken oder kann einen Informationsverlust bis zum Zelltod bedeuten. Im Laufe der Evolution haben Zellen verschiedene effektive enzymatische Reparaturmechanismen entwickelt, um übermäßige Schädigungen durch DNA- Modifikationen zu unterdrücken.

Die mitochondrialen Mutationen können grundsätzlich an die Tochterzellen weitergegeben (Seggregation) werden, sodass eine Zunahme der Deletionen über die Zeit, unabhängig von den immer neu entstehenden Mutationen, erklärt werden kann.
Zusätzlich kommt es im Alter zu einem generellen Leistungsabfall in den Mitochondrien, sodass Funktionsstörungen durch zusätzliche mtDNA-Mutationen verstärkt werden. Ferner können chemische (Cytostatika, intrazelluläre Substrate wie Radikale) und physikalische (energiereiche Strahlen, wie UV- oder ionisierende Strahlung) Faktoren, je nach Energiegehalt direkt oder indirekt zu numerischen oder strukturellen Basenmodifikationen, Strangvernetzungen, Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen (Lodish et al., 1996; Berneburg et al., 1999).
Große Deletionen im mitochondrialen Genom führen zwangsläufig zu dem Verlust funktionell wichtiger Bereiche. Damit geht häufig eine Beeinträchtigung der Enzyme der Atmungskette einher, vor allem im Komplex IV (Cytochrom-Oxidase) (Hseih et al., 1994).
Die meisten mtDNA Deletionen wurden zwischen dem D *(displacement)* -Loop und O_L gefunden, da dort der L-Strang während der Replikation ungeschützt vorliegt (Bank et al., 2000). Neben den zufälligen Schädigungen der mtDNA können die ROS auch zu spezifischen Deletionen führen, wie im Folgenden näher erläutert wird. Über 100 verschiedene Deletionen (3400–10400 bp) konnten bislang nachgewiesen werden (Ruiz-Pesini (Mitomap) et al., 2007) (s. **Abb**.4).
Die häufigste Deletion der mtDNA ist die 4977bp-Deletion, auch als *„common deletion“* bekannt. Sie kommt in vielen verschiedenen Geweben vor und kann sowohl in vitalen (Simonetti, 1992) als auch postmortal entnommenen Gewebe nachgewiesen werden (Meißner et al., 2008).
Die 4977bp-Deletion ist von zwei 13 bp langen Wiederholungssequenzen (= *direct repeats*) flankiert (nt 8470 - 8482 und 13447 - 13459). Ist die DNA z.B. oxidativ geschädigt (hoher 8-OH-dG-Anteil) können sich die beiden Stränge voneinander trennen und im Bereich der Repetion eine Schlaufe bilden, die dann bei der Replikation verloren geht. Dadurch kommt es zu dem spezifischen Verlust einer 4977bp langen Sequenz (Simonetti et al., 1992; Lee et al., 1994) (s. **Abb**.5).

Die Sequenz der *„common deletion“*:

CCACCT**ACCTCCCTCACCA**AAGCC **4,9 Kb** CTTCA**ACCTCCCTAACCA**

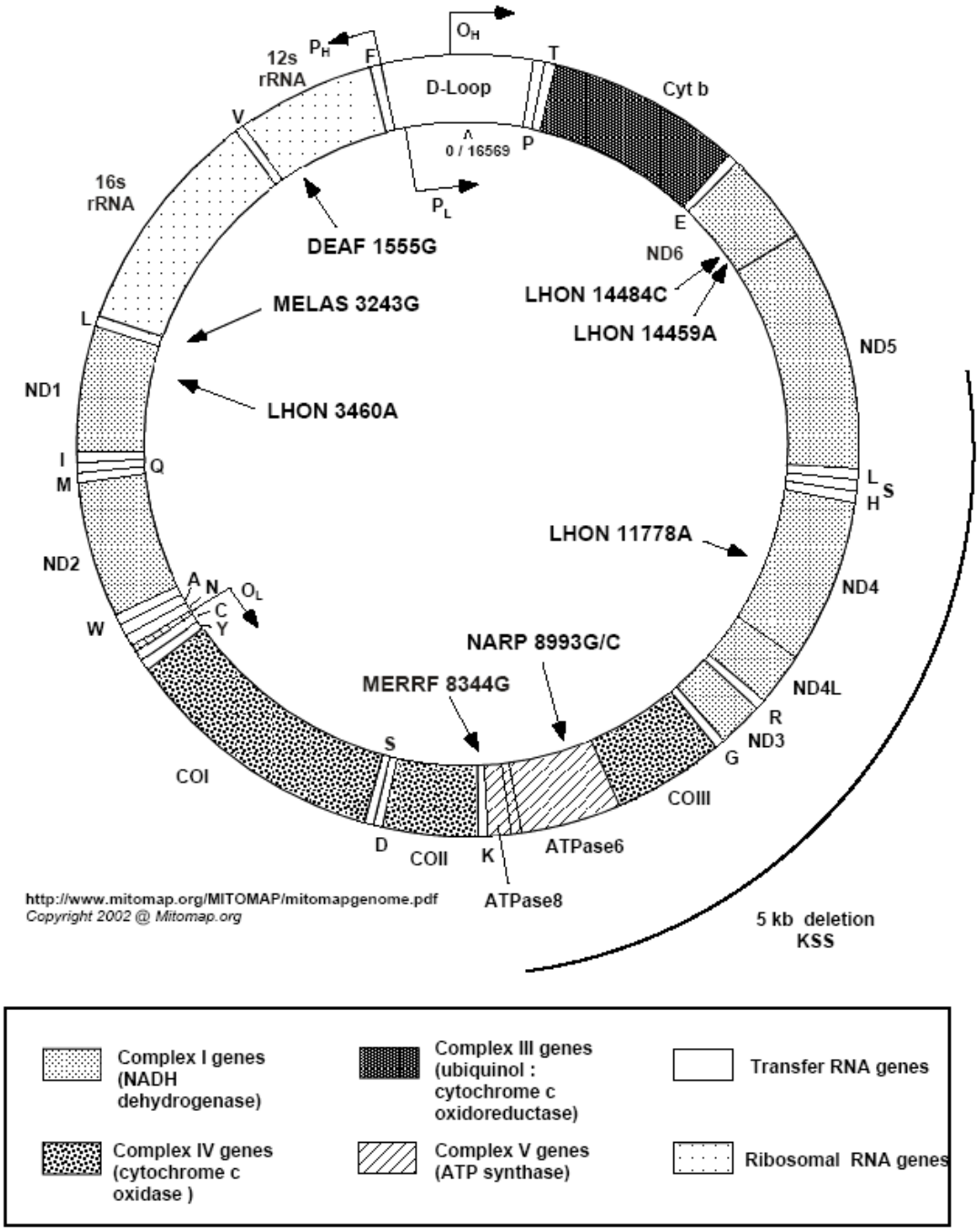


Abb.4: Das humane mitochondriale Genom (schemat. Darstellung), entschlüsselt von Anderson et al. (1981) mit den Ansatzstellen (=O) für den H- und L-Strang. Außerdem sind die Bereiche für häufige Mutationen dargestellt, die im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen stehen. Der Kreisausschnitt unten rechts beschreibt den Bereich, der bei der (4977 bp-) deletion betroffen ist MITOMAP, (Ruiz-Pesini, 2007).

Im Jahr 1989 haben Shoffner et al. ein Modell (Verschiebe-Replikationsmodell) zum Entstehungsmechanismus mitochondrialer DNA-Deletionen vorgeschlagen. Das „Slip-replication"-Modell beruht auf der Vermutung, dass die zuvor beschriebenen Nukleotid-Wiederholungen sich bei der Replikation zu einer falschen Basenpaarbindung finden könnten. Als Folge würden ein normales und ein deletiertes mtDNA-Molekül vorliegen (Elson et al., 2001).

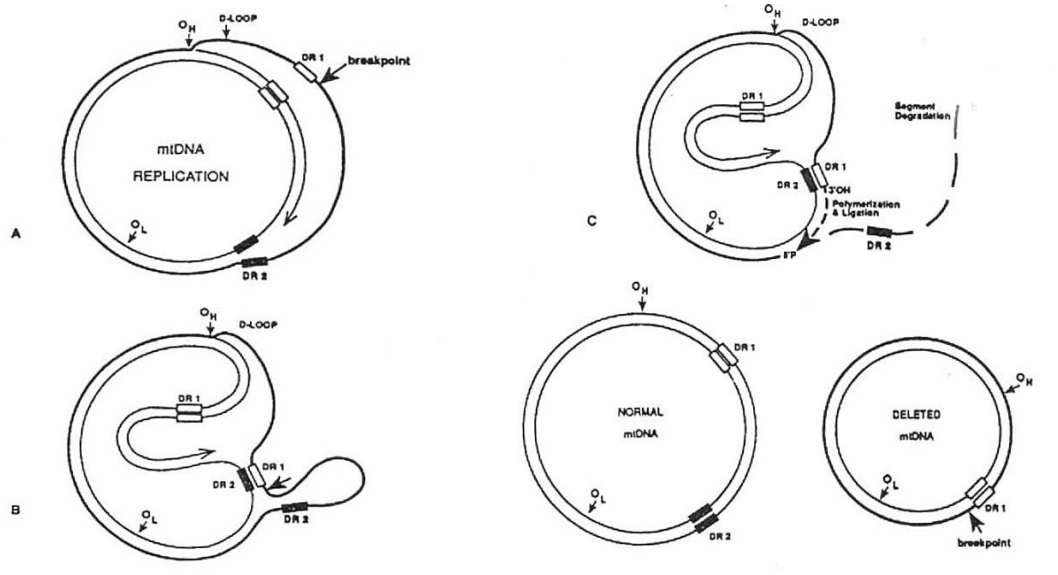


Abb.5: Modell zur Entstehung der 4977bp-mtDNA Deletion (mod. nach Shoffner et al., 1989)

A: Die mtDNA-Replikation fängt bei O_H mit der Trennung beider Stränge an.

B: Fehlpaarung von DR1 (H-Strang) mit DR2 (L-Strang) führt zur Schleifenbildung am H-Strang.

C: Bruch des H-Stranges hinterlässt ein freies enzymatisch bis zum Doppelstrang abzubauende Ende und das 3'OH-Ende welches anhand der L-Strang-Matrize verlängert wird. Das freie 5'-Ende (Phosphat) wird mit dem 3'OH-Ende des verlängerten Stranges ligiert.

D: Es entsteht ein normales mtDNA-Molekül aus dem L-Strang und ein deletiertes mtDNA-Molekül aus dem veränderten H-Strang (Shoffner et al.,1989).

Zur Genese der 4977bp-Deletion wird auch eine zweite Theorie diskutiert. Aktuellere Studien beschreiben, dass ein möglicher Enstehungsmechanismus auf der Bildung von Doppelstrangbrüchen basiert. Diese induzieren dann multiple mtDNA-Deletionen, wie auch die *„common deletion"* (Prado et al., 2003; Srivastava & Moraes, 2005; Phadnis et al., 2005). Aber auch andere Erklärungen zur Deletionsentstehung wie homologe Rekombinationen oder insuffiziente Reparaturmechanismen sind noch nicht widerlegt (Phadnis et al., 2005).

1.6 Krankheiten aufgrund mitochondrialer Defekte

Unter dem Begriff „Krankheiten aufgrund mitochondrialer Defekte“ sollen alle diejenigen klinischen Erscheinungsbilder zusammengefasst werden, die aus Störungen der strukturell und funktionell im Mitochondrium lokalisierten Stoffwechselabläufe entstehen (Mito NET, 1999).

Sowohl Störungen der Atmungskette als auch der β-Oxidation können verschiedene Organe betreffen und dort Erkrankungen hervorrufen. Die Symptome sind am deutlichsten in postmitotischem Geweben wie Muskel und Gehirn ausgeprägt, da diese auf einen hohen Energieumsatz angewiesen sind. In zahlreichen Studien ist ein Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutationen und Myopathien bzw. Enzephalomyopathien nachgewiesen worden (Schon et al., 2003).

Aufgrund der vielen Möglichkeiten die oxidative Phosphorylierung einzuschränken, ergibt sich eine enorme Komplexität der klinischen Erscheinungsbilder (Shoffner et al., 2001).

Die Abnahme der Energiefunktionen und die Zunahme der Produktion von ROS in den Mitochondrien sind entscheidende Voraussetzungen zur Entstehung von mitochondrialen Erkrankungen. Ebenso kann durch verstärkten oxidativen Stress, welcher letztlich zum programmierten Zelltod führt, eine Erkrankung durch Zellverlust entstehen (Wallace et al., 1995). Als klassische mitochondriale Myopathien werden folgende Symptomkomplexe beschrieben:

Beim **MELAS** sind **M**yopathie, **E**nzephalopathie, **L**aktat**a**zidose, **S**chlaganfälle die klassischen Symptome dieses Syndroms, das im ganzen Organismus seine Ausprägung findet (Kirkinezos & Moraes, 2001; Iizuka et al., 2005).

Die Abkürzung **MERRF** steht für **M**yoklonus**e**pilepsie mit **r**agged **r**ed **f**ibres, die sich im Muskelbiopsat und in allen Bereichen des ZNS als Anhäufung von Triochrom-gefärbten abnormen Mitochondrien nachweisen lassen (Wallace, 1999).

Beim **Kearns-Sayre-Syndrom (KSS)** handelt es sich um einen Cytochrom-C-Oxigenase-Mangel, der sich klinisch als Ophthalmoplegia externa mit Ptosis und Doppelbildern ausdrückt. Häufig tritt auch eine progressive Demenz auf (Kim & Chi, 1997; Suomalainen, 1997).

Bei allen Erkrankungen durch Defekte des mitochondrialen Stoffwechsels ist keine kausale Therapie möglich.

Mitochondriale Defekte scheinen ebenfalls zur Entstehung verschiedener neuromuskulärer bzw. -degenerativer Erkrankungen beizutragen (Wallace, 2001). Es

wurden Zusammenhänge zwischen der Zunahme freier Radikale und der Zunahme mitochondrialer Deletionen in verschiedenen Hirnregionen untersucht.

Ein möglicher Zusammenhang wurde bei der amyotrophen Lateralsklerose (Rosen et al., 1993 u.a.), Chorea Huntington (Browne et al., 1997 u.a.), dem Morbus Parkinson (Ozawa, 1999 u.a.) und dem Morbus Alzheimer (Ohta & Ohsawa, 2006) nachgewiesen. Morphologisch konnten im ZNS Verkalkungen, Hirnatrophie und hypodense Areale gefunden werden (Lezza et al., 1999; Polidori, 1999; Finsterer, 2006; Schapira, 2006).

Auch bei verschiedenen Formen der Kardiomyopathien wurde in zahlreichen Studien eine Häufung mitochondrialer Mutationen beschrieben. (Ozawa, 1999 ; Marin-Garcia, 2000). Ferner wurde in ischämisch geschädigter Herzmuskulatur eine Häufung der 4977bp-Deletion und eine damit korrelierende Abnahme der oxidativen Phosphorylierung beobachtet (Corral-Debrinski, 1992; Mohamed et al., 2006).

Bei verschiedenen anderen Leiden wird vermutet, dass die mitochondrialen DNA-Schäden ebenfalls einen Einfluss auf die Ausprägung haben. Hierzu zählen z.B. Diabetes mellitus (Ballinger et al., 1996), Multiple Sklerose (Kalman et al., 1996), Epilepsie (Patel, 2002), bipolare Störungen (Kato & Kato, 2000) und Leberzirrhose (Yamamoto et al., 1992). Außerdem wird die Beziehung zwischen vermehrten freien Radikalen in der Tumorgenese diskutiert (Bianchi, 1995; Beal, 2005).

1.7 Einfluss des oxidativen Stress auf mtDNA und die Alterungstheorie

Die DNA der Mitochondrien ist von oxidativen Schäden durch ROS am meisten betroffen, da hier der größte Anteil freier Radikale in einer Zelle entsteht. Hinzu kommt, dass die mtDNA über verminderte Reparatur- und Korrekturmechanismen verfügt. Zudem weist sie keine Histone und keine Introns auf, so dass Mutationen immer zu einem veränderten Genprodukt führen können (Arnheim et al., 1992; Miquel, 1998).

ROS können dazu beitragen, ionentransportierende Enzyme (Na-/K-ATPase, Ca-ATPase) zu stören, die Permeability-Transition-Pore (PTP) in der mitochondrialen Innenmembran zu öffnen und die Apoptose einzuleiten (Cortopassi et al., 1999).

Besonders in energieverbrauchenden Geweben des Menschen, wie Muskulatur oder Nervengewebe lassen sich ROS-induzierte Schäden in einem altersabhängigen Anstieg von defekten mtDNA-Molekülen nachweisen. So wiesen Piko et al. altersabhängige Mutationen der mitochondrialen DNA nach, indem sie elektronenmikroskopisch nach Mismatch-Segmenten bei Mäusen suchten. Es konnten bei nur 1% der jungen Mäuse

doch bei 5% der älteren Mäuse mtDNA-Veränderungen festgestellt werden (Piko et al., 1998).

Auch bei Menschen existieren Befunde, die für eine altersabhängige Akkumulation von mtDNA-Schäden sprechen, da bei Feten und gesunden Neugeborenen keine Deletionen nachzuweisen sind. Ab dem 20 Lebensjahr sind sie detektierbar (Hsieh et al., 1994) und erreichen bei den über 70jährigen höchste Werte (Lee et al., 1994; Liu et al., 1998; Melov et al., 1999).

Die altersabhängige Akkumulation der 4977bp-Deletion der mtDNA im Herz- und Hirngewebe konnte in einer Untersuchung von mehr als 30 verschiedenen Geweben gezeigt werden. Es wurde vermutet, das dementsprechend starke oxidative Schädigungen zu postulieren seien, da diese Gewebe einen entsprechend hohen Sauerstoffverbrauch aufweisen. Überdies wurde in den verschiedenen Gehirnregionen eine unterschiedliche Menge deletierter mtDNA festgestellt, was möglicherweise mit der ungleichen Stoffwechselaktivität zu erklären ist (Arnheim et al., 1992). Die Akkumulation der 4977bp-Deletion der mtDNA zeigte sich verstärkt in ausdifferenzierten, also postmitotischen Geweben, wie Herz- und Skelett-Muskulatur und Gehirn. Scheinbar findet dort als Folge einer chronischen Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies die vermehrte Akkumulation statt. (Lee et al., 1994). In der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Akkumulation der 4977bp-Deletion mit steigendem Lebensalter im Skelettmuskel (*M. iliopsoas*) festgestellt (Meissner et al., 1999).

Während unter physiologischen Bedingungen maximal 0,3 % der gesamten mtDNA deletiert sein können, kann der Anteil der deletierten mitochondrialen DNA in pathologisch veränderten postmitotischem Gewebe, wie z.B. im Nervengewebe eines Parkinson-Patienten bis zu 5 % betragen (Ozawa, 1999). Ferner wurde festgestellt, dass bei Herzerkrankungen oder ischämisch geschädigter Herzmuskulatur eine deutliche Anhäufung der 4977bp-Deletion vorlag (Corral-Debrinski et al., 1992).

Bei Ischämie wird die Blutzufuhr in den Gewebearealen unterbrochen, woraus durch den Sauerstoff- und Substratmangel, je nach Dauer der Mangeldurchblutung, Gewebeschäden resultieren. Parallel zur Zunahme der 4977bp-Deletion mit dem Alter ist eine Aktivitätsabnahme der Atmungskettenenzyme, besonders der Cytochrom C-Oxidase, zu beobachten (Hsieh et al., 1994; Kopsidas et al., 2000). Allerdings nimmt auch die Aktivität der Enzyme, die für die Neutralisierung der freien Radikale zuständig sind, mit zunehmendem Alter ab (Lu, 1999).

Auch wenn viele der aufgeführten Ergebnisse die *mitochondrial theory of* aging schlüssig zu erklären scheinen, haben neuere experimentelle Erkenntnisse dazu geführt die mitochondriale Alterungstheorie erneut zu überdenken (Meissner, 2007).

In Einzelzellexperimenten und anhand mathematischer Computermodelle wurde der Nachweis von schon im jungen Alter zufällig enstehenden, sich klonal in einer Zelle oder Muskelfaser vermehrenden Mutationen erbracht, die dann altersabhängig zur lokalen Beeinträchtigung der zellulären Energieversorgung führen (Storm et al., 2002; Taylor et al., 2003). Tierexperimentell konnte bei sogenannten *Mutator*-Mäusen gezeigt werden, dass aufgrund des defekten Reparaturenzyms POLG (Polymerase γ) viele mitochondriale Mutationen auftreten und eine Voralterung zu erkennen ist. Es findet sich jedoch kein kein erhöhter oxidativer Stress oder eine vermehrte ROS-Produktion (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2005).

Ein endgültiger Beweis für den Zusammenhang von Deletionen, stochastischen Punktmutationen, ROS-Produktion, oxidativem Stress und dem Altern scheint allerdings noch nicht gefunden (Sohal et al., 2002; Khrapko & Vijg, 2007).

1.8 ZIEL der ARBEIT

Die Akkumulation der 4977bp-Deletion in der mtDNA soll in 11 Altersklassen in den fünf verschiedenen Hirnabschnitten durch Amplifikation mittels einer PCR untersucht werden, um Anhaltswerte für den prozentualen Anteil der Deletion in diesen Altersgruppen zu erhalten. So soll systematisch untersucht werden, wie sich die Akkumulation der 4977bp-Deletion in den verschiedenen Arealen unter physiologischen Bedingungen mit zunehmendem Alter ausprägt.

Aus rechtsmedizinischer Sicht stellt sich die Frage, ob es möglich und praktikabel ist, durch die Bestimmung des Anteils der 4977bp-Deletion der mtDNA in Geweben, Rückschlüsse auf das Lebensalter zu ziehen. Eine weitere Überlegung wäre, ob durch die Erfassung der mitochondrialen DNA-Deletionen in unterschiedlichen Geweben Aussagen über die pathophysiologischen Geschehensabläufe möglich sind, die am Tode eines Individuums beteiligt gewesen sein könnten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Extraktion der Gesamt- DNA aus Hirngewebe

2.1.1 Probenmaterial

Die für die Versuche benötigten Proben stammen aus Obduktionen der Jahre 1996 bis 2000 aus dem Institut der Rechtsmedizin der Universität Lübeck.

Es wurden bei über 200 Fällen jeweils 500 mg Gewebe der durch Fragestellung definierten Hirnareale postmortal entnommen. Dabei handelte es sich um *Substantia nigra, Putamen, Nucleus caudatus, Cortex cerebri, Cortex cerebelli* und Skelettmuskulatur des M. iliopsoas.

Aus diesen wurden 50 Fälle ausgewählt, bei denen es sich um akut verstorbene Personen handelte. Diese wurden dann in 11 verschiedene Altersgruppen eingeteilt:

Gruppe 1: jünger als 18 Monate	Gruppe 2: 18 Monate – 10 Jahre
Gruppe 3: 11 Jahre – 20 Jahre	Gruppe 4: 21 Jahre – 30 Jahre
Gruppe 5: 31 Jahre – 40 Jahre	Gruppe 6: 41 Jahre – 50 Jahre
Gruppe 7: 51 Jahre – 61 Jahre	Gruppe 8: 61 Jahre – 71 Jahre
Gruppe 9: 71 Jahre – 80 Jahre	Gruppe 10: 81 Jahre – 90 Jahre
Gruppe 11: älter als 91 Jahre	

Zu den Todesursachen gehörten Ertrinken, Ersticken, Verbluten, Strangulation, andere akut tödliche Traumata oder in der jüngsten Gruppe (1, jünger als 18 Mon.) der plötzliche Kindstod SIDS.

Die Liegezeit vor der Probenentnahme lag zwischen 12 und 48 Stunden, die Fälle mit bereits eingetretenen Fäulniserscheinungen fanden in unserer Testreihe keine Berücksichtigung. Die Proben wurden nach Entnahme umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterbearbeitung bei –70 °C aufbewahrt.

2.1.2 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung der Gesamt- DNA aus dem Hirngewebe wurde das Extraktionskit Super Quick Gene (SQG 1) der Firma Immucor (Rödermark, Deutschland), gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Jeweils 200 mg der verschiedenen Hirnareale wurden mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und in 50 ml Röhrchen überführt. Es wurden dann in jedes Röhrchen 1,5 ml WBC-Lysepuffer und 20 µl DDT (1M) hinzugegeben und zur optimalen Entfaltung der Lysewirkung 2 x 30 sec geschüttelt. Nach 2h Inkubation im 55 °C warmen Wasserbad folgte die Zugabe von 200 µl SDS (10%) und 500 µl PPR (Protein-präzipitierendem-Reagenz). Dann wurde nochmals kräftig geschüttelt und eine weitere ½ h inkubiert.

Als nächstes wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur für 20 min mit 4020 x g zentrifugiert. Der klare Überstand (ca. 2 ml) wurde danach in ein neues Röhrchen überführt und die DNA mit 2 Vol% kaltem abs. Ethanol und 0,1 Vol% 10 mM Natriumacetat gefällt, in ein 2,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und danach durch Zentrifugationen mit 15115 x g konzentriert. Im Anschluss wurde das DNA-Pellet in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet.

Zuletzt wurde das Pellet in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und für die weitere Verarbeitung bei –20 °C aufbewahrt.

2.2 Quantifizierung der extrahierten DNA

2.2.1 Photometrische Bestimmung

In den meisten Fällen erfolgte direkt im Anschluss an die Extraktion die Bestimmung der Konzentration der Gesamt-DNA mittels photometrischer Messung in einem Spektralphotometer mit Deuteriumlampe in dem Bereich zwischen 220 und 300 nm, um den Reinheitsgrad der isolierten Proben zu überprüfen. Die Nachweisgrenze für das zu messende Probenmaterial und etwaige Verunreinigungen durch Lösungsmittel liegt bei 10 µg/ml.

Zuerst wurde das Photometer mit 1 ml Aqua bidest als Referenzwert geeicht und daraufhin so programmiert, dass die gemessene DNA-Konzentration direkt in µg/ml angegeben wird. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach 50 µg doppelsträngiger DNA pro 1 ml Lösung. Für die Messung wurden dann 50 µl der extrahierten DNA-Lösung gemeinsam mit 950 µl Aqua bidest in eine Quarzküvette pipettiert, vermischt und gemessen.

Um eine Aussage über die Reinheit der DNA machen zu können, wurden die Extinktionen bei 260 nm/280 nm sowie 280 nm/230 nm ins Verhältnis gesetzt. Erstere sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 annehmen, um Verunreinigungen mit Protein und Phenol auszuschließen. Unreinheiten durch Polysaccharide oder Salze ließen sich durch einen (280 nm/230 nm) Wert bei 2,0 ausschließen (Sambrook et al., 1989).

2.2.2 Slotblot

Basierend auf den photometrisch ermittelten Konzentrationswerten wurden die Proben mit sterilem Aqua bidest auf 1 ng/µl verdünnt. Davon wurden 10 µl zur exakteren Quantifizierung des DNA-Gehaltes in einem humanspezifischem Slotblot (Gibco BRL Gaithersburg, USA) eingesetzt, mit dem die Quantifizierung einer Menge von minimal 200 pg möglich ist.

Das System besteht aus einer Slotblot-Apparatur, einer nicht-radioaktiven Sonde, einem DNA-Standard und einem Chemilumineszensfarbstoff-Substrat für die anschließende Detektion der auf einer Nylonmembran immobilisierten denaturierten DNA.

Die Slotblot-Apparatur ist eine Plexiglas-Kammer, die aus drei Teilen besteht. Die Grundplatte hat definierte Rinnen zur gleichmäßigen Verteilung des Unterdrucks. Auf ihr befindet sich ein Weichgummi-Dichtungselement, welches über 48 schlitzförmige Aussparungen (Slots) verfügt, um so unterhalb der Membran den Unterdruck weiterzuleiten. Darauf wird die Nylonmembran aufgelegt. Die Oberseite beschließt eine Plexiglas-Deckplatte mit ebenfalls 48 Slots zum Auftragen der Proben.

Bei der Sonde handelt es sich um eine einzelsträngige DNA-Sonde, die mit alkalischer Phophatase markiert ist. Sie weist die komplementäre Sequenz zu einer primaten-spezifischen α-Satelliten-Sequenz auf dem nukleären Chromosom 17 (D17Z1) auf. Der DNA-Standard wird aus humaner DNA einer Leukämie-Tumor-Zelllinie (K562) hergestellt und wurde bei jedem Lauf in einer Verdünnungsreihe von 200 pg/µl bis 40 ng/µl zusätzlich aufgetragen.

Die eigentliche Detektion wurde mit einem Chemilumineszensfarbstoff (Lumi-Phos Plus) durchgeführt. Der Nachweis erfolgte auf einem Röntgenfilm (Kodak Min-2000). Die Konzentration der Proben wurde durch visuellen Vergleich der sichtbaren Signalintensitäten gegen die des Standards bestimmt (Gibco BRL Gaithersburg, USA, Product Guide, 1994).

Die oben beschriebenen 10 µl der auf 1 ng/µl verdünnten Probe wurden anschließend mit jeweils 100 µl Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 0,5 M NaCl) in einzelnen

Eppendorfgefäßen vermischt und verblieben für 5 min bei Raumtemperatur. Ebenso wurde mit den acht Verdünnungen (0,2 ng - 40 ng) des Standards verfahren.

Ein vorbereitetes 8 cm x 12 cm großes Stück Nylonmembran wurde mit 2 x SSC angefeuchtet und in die Slotblot-Apparatur eingebracht. Nach Anlegen des Unterdrucks mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurden die acht Proben des Verdünnungsstandards und die denaturierten Proben in die Slots aufgetragen und auf der Membran immobilisiert. Anschließend wurden die Slots mit 500 µl Denaturierungslösung gespült, die Membran entnommen und dann für 5 min bei Raumtemperatur in der Neutralisierungslösung (0,2 M Tris-HCl, 2 x SSC, pH 7,5) auf einem Schüttler geschwenkt. Danach wurde die DNA durch Backen bei 80 °C für 1 h auf der Membran fixiert. Es erfolgte eine Prähybridisierung (ACES 2,0 Hybridization Solution, Gibco BRL Gathersburg, USA) für 20 min bei 50 °C im Schüttelwasserbad. Pro 1 cm² Membran wurden unterdessen 0,05 ml Hybridisierungslösung mit 0,5 µl D17Z1-Sonde vorgewärmt auf die Membran gegeben und für 2 h im Schüttelwasserbad bei 50 °C hybridisiert. Danach wurde die Membran 2 x in ACES 2,0 Waschpuffer und 1 x in Final Waschpuffer gewaschen. Für die Detektion wurde die so vorbehandelte Nylonmembran in 10 ml des Chemilumineszensfarbstoff-Substrat (Lumi-PhosPlus) für 5 min geschüttelt, dann auf eine transparente Plastikfolie gelegt und für 6 h auf einem Röntgenfilm im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Nach der Entwicklung des Films im Fotolabor wurde die Signalstärke des Chemilumineszenssignals der jeweiligen DNA-Proben mit denen des Standards verglichen.

2.3 Amplifizierung der DNA

2.3.1 PCR- Ansatz und Ablauf

Die „Polymerase Chain Reaction“ oder PCR wurde 1984 von K.B. Mullis entwickelt, der 1993 dafür den Nobelpreis erhielt. Sie erlaubt es, definierte DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und (Wirts-)Bakterien sehr schell zu amplifizieren. Man benötigt lediglich zwei DNA-Oligonukleotide, sogenannte „*Primer*“, die jeweils mit einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes komplementär sind und somit hybridisieren können. Außerdem müssen noch ausreichende Mengen der 4 Desoxyribonucleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und eine spezielle thermostabile DNA-Polymerase vorhanden sein.

Der Reaktionszyklus der PCR wird in 3 Abschnitte eingeteilt, die sich vor allem durch ihre jeweilige Reaktionstemperatur unterscheiden:

1. DNA-Denaturierung (ca. 95 °C)
2. *Primer „annealing“* (spez. nach *Primer* ca. 50 – 68 °C)
3. *Primer „extention“* (ca. 72 °C)

Dabei wird zunächst der DNA-Doppelstrang durch thermische Denaturierung in seine zwei Einzelstränge getrennt. Ein hoher Anteil an komplementären *Primer* verhindert beim Abkühlen die Wiedervereinigung der hochmolekularen DNA, die jetzt als Template für die Neusynthese dient. Die DNA-Polymerase erkennt den Komplex und beginnt an dessen freiem 3'-OH Ende mit der Synthese des Gegenstrangs. Ein zweiter DNA-*Primer* bindet im zweiten Zyklus nach erneuter Denaturierung an einer definierten Stelle am Gegenstrang, um von dort die Synthese zweier neuer Kopien des Templates zu initiieren. Es entsteht ein DNA-Fragment definierter Länge. In den folgenden Zyklen wird das Ursprungstemplate mit variabler Länge nur **linear** vermehrt, jedoch das gewünschte, zwischen den *Primern* liegende PCR-Fragment amplifiziert sich selbst hingegen **exponentiell**.

Zur Amplifikation und somit zum Nachweis der deletierten und undeletierten mtDNA wurden zwei getrennte PCR-Ansätze nach einem modifizierten (s. u.) Protokoll nach Lee et al. (1994), angesetzt.

Der exponentielle Anstieg der Amplifikate bei der PCR ist die entscheidende Grundlage für die nachfolgend beschriebenen quantitativen Messungen. Theoretisch soll sich nach jedem Zyklus die amplifizierte Menge verdoppeln, in der Praxis muss jedoch von einer Amplifikationseffizienz ausgegangen werden, die sich aus der Amplikongröße ergibt.

Ein Mastermix, der alle nötigen Komponenten bis auf die DNA enthielt, wurde für die PCR zweimal angesetzt. Beide unterschieden sich nur durch den jeweils zugegebenen *Primermix*. Der Pipettiervorgang geschah in einer sterilen Werkbank, um das Kontaminationsrisiko minimal zu halten. Die sterile Werkbank, der Thermocycler und alle Arbeitsflächen wurden regelmäßig nach bzw. vor dem Ansatz mit Natriumhypochlorid, 70 % Ethanol und Aqua bidest gereinigt.

Die *Primer*länge betrug zwischen 18 und 26 bp, die der spezifischen Amplifikate 113 bp beim Wildtyp und 123 bp Länge bei der 4977bp-Deletion. Wenn die Deletion nicht vorliegt, würde von den deletionsspezifischen *Primern* (Alt 1F u. Alt 2R) ein über 5kb langes Stück amplifiziert werden. Dies ist unter den gesetzten Bedingungen allerdings

nicht möglich, da die Extensionszeit zu kurz ist. Wenn aber in der mitochondrialen DNA die 4977bp-Deletion vorliegt, ist der von *Primern* flankierte Bereich so kurz, dass das spezifische 123 bp Fragment amplifiziert wird.

Mastermix:

Primermix (Mit/Alt 1F + 2R)	2 µl	je 10 pmol
PCR- Puffer (10 x)	2,5 µl	1 x
MgCl2	0,75 µl	1,5 mM
dNTP- Mix	2 µl	je 0,2 mM
DMSO	0,5 µl	2 %
TMAC	0,5 µl	10 mM
Platinum-*Taq Polymerase*	0,2 µl	1 Unit

Der erste Ansatz wurde wie folgt mit dem *Primer*paar Mit 1F und Mit 2R vorbereitet, dem zweiten Ansatz wurden Alt 1F und Alt 2R zugegeben. Die Additive TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) und DMSO (Dimethylsulfooxid) dienten zur Stabilisierung des Ansatztes.

Bei der Verwendung der Taq-Polymerase mußte beachtet werden, dass diese aufgrund ihrer schon bei Raumtemperatur bestehenden Aktivität erst zuletzt zugegeben wurde, um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden (Mertes et al., 1997).

Dem 15 µl Ansatz wurden 10 ng DNA (Template) in 10 µl Volumen zu einem Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz von 25 µl zugegeben. Die Amplifikate der mtDNA des Wildtyps wurde nach 14-18 Zyklen aus dem Thermocycler genommen. Der Ansatz der Deletion verblieb dort für 28 - 32 Zyklen. Es wurde für die PCR ein „Hotstart“ durchgeführt, alle Reaktionsgefäße starteten zeitgleich. (Newton & Graham, 1994).

Im Vergleich zur undeletierten DNA, ist die deletierte in erheblich geringerer Konzentration vorhanden. Daher muß man, um messbare Amplifikatmengen zu erhalten, relativ mehr Zyklen durchlaufen, wobei die Amplifikationseffizienz als bekannt vorausgesetzt wird.

Beide Ansätze liefen dann im gleichen PCR-Programm in den 2400 und 9600 Gene Amp PCR System Thermocycler (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), welches zuvor, wie im Folgenden beschrieben, programmiert wurde:

Thermocycler- Programm :

1 x	50° C	2 min
1 x	94° C	10 min
17/30 x	94° C	30 sec
17/30 x	61° C	30 sec
17/30 x	72° C	50 sec
1 x	72° C	30 min
1 x	4° C	beliebig

In jedem PCR-Lauf wurden zwei negative Kontrollproben ohne DNA (Aqua bidest) eingesetzt, die trotz Mastermixzugabe keine Amplifikate ergeben durften.
Nach der PCR wurde je 1 µl vom Wildtyp-Fragment (113 bp) und 1 µl vom Deletions-Fragment (123 bp) zur Analyse im ABI Prism™ 310-Detektionssystem (s. u.) vorbereitet.

2.3.2 Verwendete *Primer*

Um die DNA-Fragmente später mit dem nachfolgend beschriebenen Detektionssystem ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) auswerten zu können, mußten sie zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff für die Detektion markiert werden.
Es handelte sich um ein Farbstoff-Amidit (FAM) der das 5'-Ende des ausgewählten *Forward-Primer* für die PCR markiert. Die chromophore Struktur der [F]-Amidite 6-FAM besteht aus 6-Carboxyfluoreszein. Der Farbstoff, sowie ihre *Linker*, sind gegenüber den Standardkonditionen, die im Verlauf einer PCR auftreten, stabil, damit nach der bereits beschriebenen Amplifikation die Zielsequenzen an den 5'-Enden den Fluoreszenzfarbstoff tragen.

Da sich die Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe überlagern, muss pro Farbstoff-set eine entsprechende Matrix generiert werden. Diese stellt eine fixe mathematische Größe dar, welche die Grundlage zur Berechnung der analysierten Daten bildet (Applied Biosystems, Handbuch) (Mertes et al., 1997).

Für die Amplifikation eines human-spezifischen mtDNA-Fragmentes und eines spezifischen Fragmentes der 4977bp-Deletion wurden die folgenden *Primer* synthetisiert:

Name	Sequenz
Mit 1F	5'-CCC TTC GCT GAC GCC ATA-3'
Mit 2R	5'-AGT AGA AGA GCG ATG GTG AGA GC-3'
Alt 1F	5'-CAG CAT AAT TAC CCC CAT ACT CCT TA-3'
Alt 2R	5'-GAG GAA AGG TAT TCC TGC TAA TGC-3'

Die *Primer* Mit 1F und Alt 1F wurden bei der Herstellung mit 6-FAM markiert.

Das *Primer*paar Mit 1F und Mit 2R bindet komplementär an den ND1-Bereich der humanen mtDNA und amplifiziert ein 113 bp großes Fragment. Im Bereich der ND5 bindet der *Primer* Alt 1F, im Kodierungsbereich der ATPase 6/8 beginnt Alt 2R mit der Amplifikation. Beide amplifizieren dann ein 123 bp großes Fragment, wenn die 4977bp-Deletion vorliegt.

Die oben erwähnten *Primer*, bezogen von der Firma Applied Biosystems, wurden als *Primermix* (je 10 µl) in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei –20 °C gelagert, um ein Degradieren der *Primer* durch häufiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.

2.4 Detektion der Fragmente

2.4.1 Auftrennung und Detektion der Amplifikate auf Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zu einer ersten orientierenden Auswertung der Amplifikate und vor allem zur Optimierung der Konzentration in den DNA-Verdünnungen für die PCR benutzt. Das Prinzip der Elektrophorese besteht darin, dass Moleküle nach ihrer Ladung und Größe im elektrischen Feld getrennt werden. Die dreidimensionale Matrix des Polyacrylamids wirkt dabei wie ein Sieb.

Da die meisten Biomoleküle aufgrund ihrer ionisierbaren Gruppen Ladungen tragen, ist die Elektrophorese eine wichtige analytische Methode zur Untersuchung verschiedener Substanzgemische.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde Acrylamid eingesetzt, das als Aminocarbonyl-Verbindung in wässriger Lösung und in Gegenwart von freien Radikalen zu langen Ketten polymerisiert. Die Porengröße der Gelmatrix wurde durch die Konzentration der einzelnen Komponenten (totale Monomerkonzentration % T und Crosslinkerkonzentration % C) festgelegt. Sie konnte den aufzutrennenden Fragmenten entsprechend gut eingestellt werden (Sambrook et al, 1989).

Für die Gelelektrophorese wurden 0,4 mm dicke Gele des Formates 24 x 12 cm mit einer Zusammensetzung von Acrylamid 40 % (5 ml), Aqua bidest (7 ml) und 120 mM Tris-Formiat (12 ml, 60 mM im Gel) angesetzt. Dann wurden zu jedem Gelansatz 240 µl Bromphenolblau (10 %, 0,1 % im Gel) und 24 µl TEMED (0,1 % im Gel) gegeben. Die Blaufärbung des Gels machte bei der Elektrophorese die Lauffront leichter erkennbar, so dass Verunreinigungen mit Acrylamid eher auffielen.

Die Gellösung wurde auf Gelbondfolie zwischen zwei Glasplatten gegossen („Flaptechnik“) (Haas et. al, 1994). Hierbei dienten zwei Lagen Dymoband an den Rändern der Glasplatten als Begrenzung und definierten gleichzeitig die Geldicke.

Nach 30 min war das Polyacrylamid auspolymerisiert und das Gel konnte umgehend benutzt werden. Außerdem war es möglich, es für wenige Tage bei +4 °C aufzubewahren.

Das Gel wurde mit der Folie auf die Keramikplatte der Elektrophorese-Kammer gelegt.

Als Anode diente ein im Elektrodenpuffer getränkter 1 cm breiter Blottingpad-Streifen am oberen Rand des Gels. Ein aus dem gleichen Puffer gegossener, ebenfalls 1 cm breiter 3 %iger Agarosestreifen am unteren Gelrand fungierte als Kathode.

Zum Auftragen der Proben wurden 0,4 x 0,3 cm große Fiberglasplättchen (Application pieces, Pharmacia, Erlangen) in 0,2 cm Abstand etwa 1 cm unterhalb der Kathode auf dem Gel platziert.

Es können bis zu 32 Proben pro Gel aufgetragen und getrennt werden, indem mittig jeweils 8 µl der amplifizierten Proben und der Negativ-Kontrollen und an beiden Rändern 4 µl der „Leitern“ des Größenstandards (hier pUC 19) auf die Plättchen pipettiert werden. Anschließend wurde der Elektrophoreselauf mit folgenden Einstellungen gestartet: 1000 V, 50 mA und 25 W als Grenzen bei einer konstanten Temperatur von 15 °C. Die Elektrophorese lief dann für ca. 45 min, bis die Bromphenolblaufront mindestens 6,5 cm in Richtung der Anode gelaufen war. Danach erfolgte die Detektion der aufgetrennten DNA-Amplifikate mit einer modifizierten Silberfärbung (Bassam et. al, 1991; Sanguinetti et. al, 1994).

Nach Ende des Laufes wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und in einer Färbewanne für 7 min in Salpetersäure (1 %) auf einem Schüttler geschwenkt, bis sich die Bromphenollinie gelb verfärbt hatte. Danach wurde kurz mit Aqua bidest abgespült und für 20 min in einer Silbernitratlösung (0,2 %) eingefärbt.

Anschließend wurde die Lösung abgegossen, entsorgt und das Gel erneut mit Aqua bidest gespült, um das restliche Silber zu entfernen. Es erfolgte nun die Entwicklung mit einer Dinatriumcarbonatlösung (Na_2CO_3 0,28 M mit 1 ml Formaldehyd pro 5 l → Stock-Stammlösung) bis die DNA-Banden sichtbar wurden. Nach einem Spülen mit Aqua bidest wurde zum Stoppen und Fixieren für 5 min 10 %ige Essigsäure zugegeben, wiederholt gespült (ca. 5 min) und abschließend für mindestens 2 h in Glycerol (5 %) fixiert.

Im Folgenden wurde das Gel auf Whatmanpapier über Nacht getrocknet, mit Kopierfolie beklebt und beschriftet, um so eine beliebig lange Aufbewahrung zu ermöglichen.

2.4.2 Detektion der Fragmente in ABI PRISM ™ 310 Genetic Analyzer

ABI Prism™ Systeme sind mikroprozessorgesteuerte Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionssysteme, die aus Hardware (Computer für die Datenaufnahme und für die Systemsteuerung) und Software (Datenanalyse) bestehen.

Die Elektrophorese im ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer erfolgte in Kapillaren von 50 µM Querdurchmesser, die vor jeder Trennung mit einem Trenn-Polymer gefüllt wurden. Das Hauptstück der Detektionseinheit dieses Systems war ein 10 mW Argonlaser, dessen Hauptemissionen bei Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm lag. Der Laserstrahl wurde auf das durchsichtige Glasfenster der Kapillare gerichtet (s. **Abb.** 6).

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden unter denaturierenden Bedingungen in der Kapillare nach ihrer Größe aufgetrennt. Sobald das Fragment den Bereich passierte, auf den der Laserstrahl gerichtet war, wurde das markierte Fragment zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlen angeregt, welche mit einer Linse fokussiert wurden.

Das Licht wurde dann in einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten und die Daten von einer CCD-Kamera (Charge Couplet Device) aufgenommen. Diese wurden weiter zu einem Macintosh Computer geleitet, wo sie von der Software (Gene Scan-Software Analysis 2.1) analysiert und ausgewertet werden konnten (Mertes, 1997).

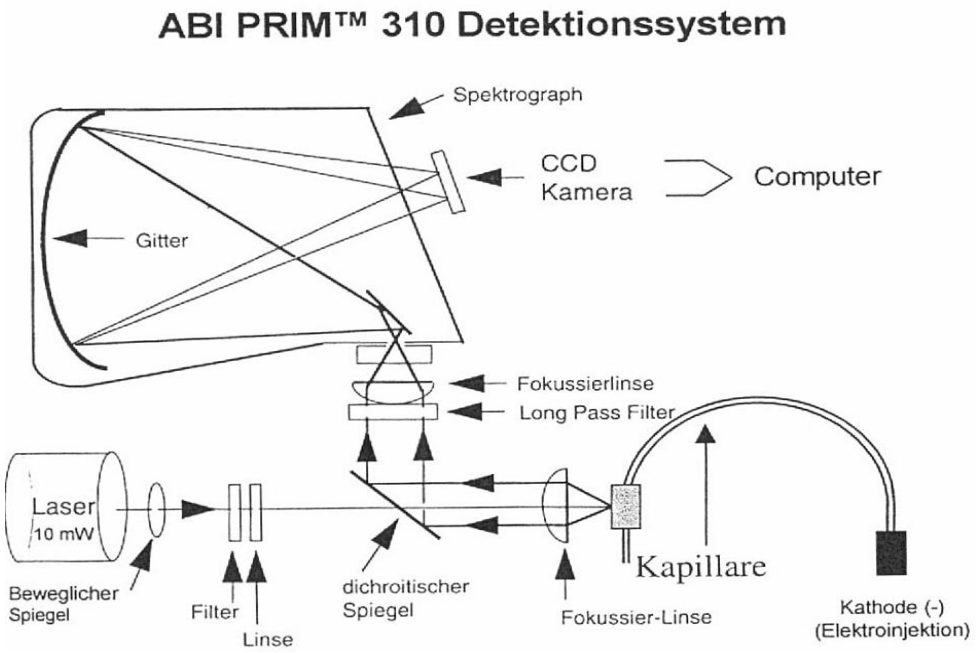


Abb.6: Das Laserlicht erreicht über ein Linsen- und Filtersystem die Kapillare. Im Detektionsbereich werden die Fluoreszenzfarbstoffe der markierten Fragmente angeregt. Das Emissionslicht verlässt über den gleichen Weg die Kapillare wie das einfallende Laserlicht. Über den halbdurchlässigen Spiegel werden dann das Emissionslicht und das Laserlicht getrennt. Ein Spektrograph mit Hohlspiegel zerlegt das emittierte Licht in seine Spektralfarben, die von dort auf die CCD-Kamera projiziert und computergestützt detektiert werden (Modifizierte Abbildung und Beschreibung des Herstellers, Applied Biosystems, 1997)

Für die Detektion wurden nun je 1 µl vom Wildtyp- und vom Deletions-Fragment in 0,5 ml Genetic Analyzer Sample Tubes überführt. Hinzu wurden 13,8 µl Formamid und 0,2 µl interner Längenstandard (ROX) gegeben. Dieser enthielt neun verschiedene Größenstandards zwischen 50 bp und 500 bp Größe. Die Proben wurden dann mit Gummisepta verschlossen, für 3 min bei 95 °C denaturiert, anschließend bei –20 °C abgekühlt und nach einer entsprechend den Herstellerangaben durchgeführten Kalibrierung gemessen. Ein Messvorgang dauerte etwa 25 min. Es konnten maximal 48 Proben pro Lauf gemessen werden. Ein Teil der Probe wurde durch Elektroinjektion mit Hilfe einer Elektrode automatisch in die Kapillare injiziert, dort wurden, wie zuvor detailliert beschrieben, die Rohdaten ermittelt, welche nach Computeranalyse als Kurven bzw. Elektropherogramme der unterschiedlichen Fragmente auf dem Bildschirm dargestellt wurden. Für die Quantifizierung und Größenmessung wurde mittels der Gene Scan Analysis Software 2.1 ein Flächenintegral unter der Kurve ermittelt, das der Menge der spezifischen Amplifikate entsprach (s. **Abb**. 9).

2.5 Statistik und Auswertungsprogramme

Für die mit Hilfe der (Singleplex-)PCR quantifizierte mtDNA der verschiedenen Hirnabschnitte wurde eine statistische Auswertung durchgeführt.

Jede Probe (d.h. jeder Hirnabschnitt von jedem Fall) wurde bis zu sechsmal in der PCR amplifiziert und folgend im ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer gemessen. Das Flächenintegral unter der Kurve entsprach der detektierten Menge. Aus den drei Messungen wurde der Median ermittelt. Die Korrelation zwischen dem Alter der Personen und der Menge der 4977bp-Deletion wurde durch eine Regressionsanalyse ermittelt, wobei das Alter (= X) graphisch in einer Exponentialfunktion und auch halblogarithmisch gegenüber der prozentuale Menge der deletierten mtDNA (= Y) aufgetragen wurde. Der nicht-lineare (Rang-)Korrelationskoeffizient „r“ und das Konfidenzintervall errechneten sich durch eine nicht-parametrische Regressionsanalyse nach Spearman. (s. auch Kap. 3.5). Dazu wird mit den jeweiligen Variablenpaaren X und Y vom ersten bis zum n-ten Paar eine Rangtransformation durchgeführt und dann nach der unten aufgeführten Formel der Korrelationskoeffizient berechnet.

$(x_1, y_1),...,(x_n, y_n)$

Rangtransformation in

$(R^x{}_1, R^y{}_1),...,(R^x{}_n, R^y{}_w)$

$D_n = R^x{}_n - R^x{}_n, n = 1,..., N$

$$r_S = \frac{\sum (R^x{}_n - \overline{R}^x)(R^y{}_n - \overline{R}^y)}{\sqrt{(\sum (R^x{}_n - \overline{R}^x)^2)(\sum (R^y{}_n - \overline{R}^y)^2)}}$$

In jeder Altersgruppe wurde die jeweilige Standardabweichung der Deletionsmenge mit Hilfe des SPSS 11.0 Statistikprogramms ermittelt. (SPSS GmbH, München, Deutschland). Alle anderen Tabellen und Grafiken wurden mit dem Tabellen- und Kalkulationsprogramm EXCEL XP (Microsoft, USA) erstellt.

3. ERGEBNISSE

Es wurden in dieser Arbeit die Veränderungen der mitochondrialen DNA in verschiedenen Proben von post mortem entnommenem Hirngewebe erfasst. Mit Hilfe spezifischer *Primer* wurde in den Geweben die 4977bp-Deletion nachgewiesen. Im Folgenden wurden die Quantifizierungsergebnisse interindividuell und intraindividuell verglichen.

Bei den interindividuellen Unterschieden wurde die Korrelation zum Lebensalter untersucht, intraindividuell konnten Unterschiede der verschiedenen Hirnabschnitte überprüft werden.

Für die Darstellung der reproduzierbaren Ergebnisse der PCR-Läufe dienten zwei verschiedene Detektionssysteme: die Polyacrylamidgele und das Laserdetektionssystem ABI Prism ™ 310.

3.1 Quantität und Qualität der DNA

Die Qualität der DNA konnte näherungsweise schon während der Extraktion beurteilt werden, denn in der Fällung der hochmolekularen DNA mit kaltem absolutem Ethanol stellte diese sich als Flocke dar. Diese Beobachtung konnte regelmäßig bei der extrahierten DNA der Kleinhirnproben gemacht werden und vereinzelt auch bei allen anderen Abschnitten. Hier fiel die DNA im Allgemeinen in kleineren Komplexen aus und wurde durch fraktionierte Zentrifugation angereichert.

Protein- und Lösungsmittelverunreinigungen, die inhibierend auf die folgende PCR wirken, wurden vorher bei der photometrischen Messung erfasst, wie detailliert im vorangehenden Kapitel „Material und Methode“ erläutert wurde (vgl. Sambrook et al., 1989). Ebenso konnte in der photometrischen Messung eine vorläufige Aussage über die Extraktionsausbeute in den verschiedenen Hirnabschnitten getroffen werden. Die Werte lagen bei Substantia nigra, Putamen, Nucleus caudatus und Großhirnrinde variierend zwischen 5 und 200 ng/µl, beim Kleinhirn zwischen 200 bis zu 800 ng/µl. Dies entspricht 0,025–1 bzw. 1–4 µg DNA pro mg eingesetztem Gewebe.

Nach der so durchgeführten Korrektur der Rohwerte ergaben sich für die Konzentrationen der extrahierten DNA Werte, die zwischen 20 und 300 ng/µl lagen. Dies galt für alle Hirnabschnitte, die hochmolekulare DNA des Kleinhirns nahm im Slotblot keine Sonderstellung ein. Die photometrisch bestimmten hohen Konzentrationen wurden überwiegend nach unten korrigiert.

Auf **Abb.**7 ist ein Slotblot exemplarisch dargestellt:

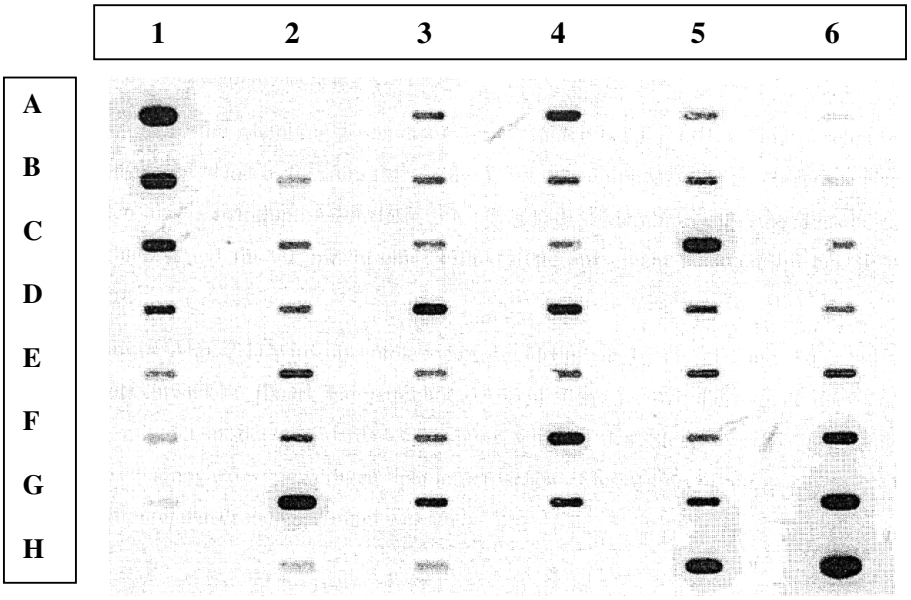


Abb.7: Exemplarisches Slotblot-Autoradiogramm zur Konzentrationsbestimmung
10 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung war in die Slots pipettiert worden. In den Spalten 1 und 6 ist der Standard in absteigender bzw. aufsteigender Konzentration aufgetragen von 40 ng bis 0,2 ng.
In der 2. Spalte wurde oben stets der Leerwert aufgetragen (Ausschluss von Verunreinigungen)
Die Konzentration der unbekannten DNA kann dann mittels Vergleich mit dem Standard erfolgen.

Vereinzelt wurden nach einem Probedurchgang der PCR und der Detektion auf Polyacrylamidgelen (s. u.) die eingesetzten DNA-Mengen noch angeglichen. Diesem Vorgang folgten die 3 PCR-Durchgänge und deren Detektion am ABI PRISM™ Genetic Analyzer.

3.2 Auswertung der Polyacrylamidgele

Die Herstellung der Polyacrylamidgele zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte diente der grob orientierenden Auswertung des Amplifikationserfolges bzw. der Ausbeute der PCR. Bevor die DNA-Proben mit dem weiter oben beschriebenen ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer quantifiziert wurden, wurde auf diese Weise überprüft, ob intakte mtDNA vorlag. Die aufgetrennten Banden wurden (vgl. Kap.2) mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Proben, die keine bzw. nur schwache Banden oder Schmieren durch Degradierung zeigten, wurden nicht in den 50 Fällen der „Altersreihe“ verwendet.

Da die Dicke der Banden neben der eingesetzten Menge der Amplifikate ebenfalls von der Zyklenzahl der PCR abhing, wurde diese in den Vorversuchen konstant bei 17 bzw. 24- 30 Zyklen für die undeletierte bzw. deletierte DNA gehalten.

In den folgenden Beispielen ist die Zunahme der jeweils rechts aufgetragenen Deletion bei älteren Individuen deutlich zu erkennen (s. **Abb**. 8):

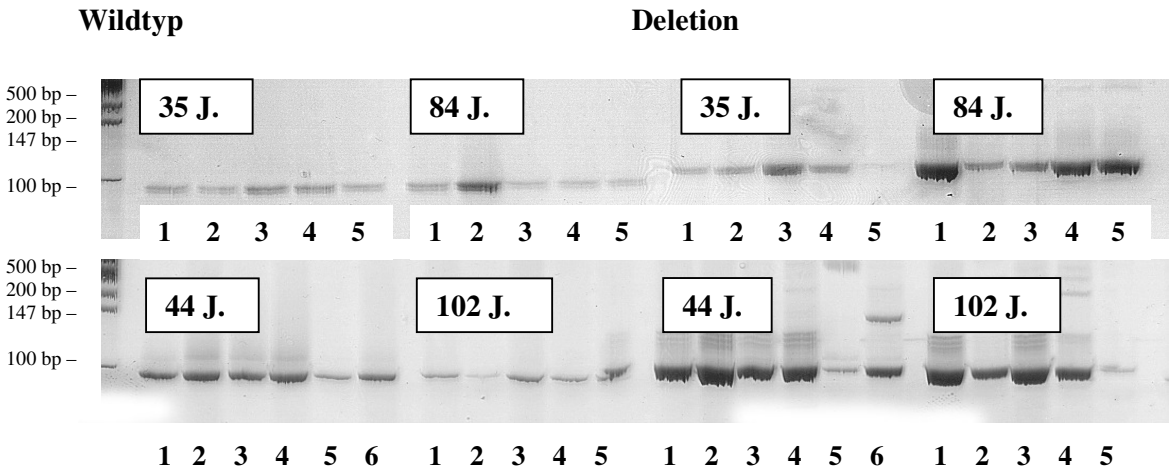


Abb.8: Verschiedene Beispiele der mittels Silberfärbung dargestellten Banden der Abschnitte 1-5/6, welche die beiden verschieden langen Amplifikate erzeugen. Oben sind die Proben eines 35- und 84jährigen und unten die eines 44- und 102-jährigen Individuums aufgetragen. Die Sonderstellung des Kleinhirns (Abschnitt 5) mit dem deutlich geringeren Deletionanteil wird deutlich.

3.3 Quantifizierung der 4977bp-Deletion der mtDNA mittels des ABI PRISM ™ 310 Genetic Analyzers

Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen groben Quantifizierung der amplifizierten mitochondrialen DNA mittels Polyacrylamidgel, stellte die Laser-Detektion ein weniger zeitaufwendiges und gleichwohl sensitives Verfahren dar, mit dem es möglich war, die große Anzahl von Amplifikaten zügig zu bewältigen. Aufgrund der sehr sensitiven Fragmentdetektion musste hier allerdings eine erheblich geringere DNA-Konzentration eingesetzt werden, nur 1 µl der 25 µl Gesamtmenge der PCR-Amplifikate.

In dieser Arbeit wurde, nachdem alle 50 Fälle zunächst auf Polyacrylamidgelen aufgetragen wurden, jeweils bis zu sechsmal die PCR mit der darauffolgenden Quantifizierung im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer durchgeführt. Parallel zu den fünf Hirnabschnitten wurde die 4977bp-Deletionbei einzelnen Proben im Skelettmuskel quantifiziert.

Dies diente zum einen der Gewährleistung der Validität der Ergebnisse und konnte außerdem als Referenzwert betrachtet werden.

3.3.1 Prinzip der Detektion

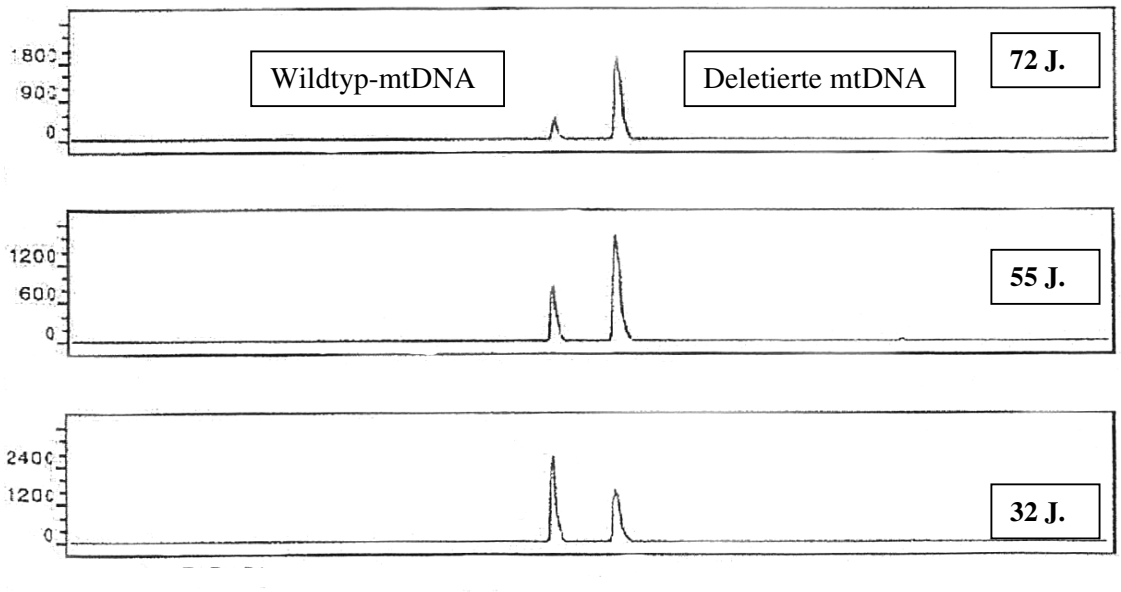


Abb.9: Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramm der Messung von 3 Proben des gleichen Hirnabschnittes unterschiedlich alter Individuen (von oben → unten abnehmendes Alter). Der linke Peak der Kurve (Size 106.71) stellt die detektierte Menge an intakter (Wildtyp-) mtDNA dar (= interner Standard), der rechte (Size 115.75) entspricht mit dem Flächenintegral unter der Kurve der Menge an deletierter mtDNA. Gemessen wurden: Größe (Size), Höhe (Peak Height) und Fläche (Peak Area).

Im ABI Prism™ 310-Detektionssystem wurden die beiden spezifischen Fragmente (Wildtyp und deletierte mtDNA) in Form von Kurven dargestellt (s. **Abb**.9).
Die Relation der beiden Flächenintegrale unter der Kurve zueinander, also die Mengen der detektierten DNA, erwies sich bei den durchgeführten drei Messungen als reproduzierbar.

3.3.2 Auswertung

Der relative Anteil der 4977bp-Deletion der mitochondrialen DNA der einzelnen Proben wurde ermittelt, indem das Flächenintegral unter der Kurve für die Wildtyp- DNA als interner Standard gewertet wurde.
Zu diesem wurde die Fläche unter dem Elektropherogramm der deletierten mtDNA ins Verhältnis gesetzt. Aus drei Messungen wurde der Median ermittelt und gegen das Lebensalter abgebildet.

Zunächst wurde in den Tabellen und Diagrammen der Anteil der deletierten mtDNA nur durch die Relation der relativen Fluoreszenz der deletierten zur undeletierten mitochondrialen DNA ausgedrückt. Durch weitere Versuche in unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch ein Umrechnungsfaktor zu einer **prozentualen** Angabe des Anteils der Deletion an der Gesamt-mtDNA ermittelt werden: Die Menge oder Konzentration des PCR-Produktes entspricht dem Flächenintegral unter der Kurve des fragmentspezifischen Peaks von Wildtyp und Deletion.

Durch Bildung des Quotienten zwischen den Integralen der beiden Peaks ergibt sich ein Zahlenwert. Dieser muß mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden. In ihn fließen die Amplifikationeffizienzen beider Fragmente, deren Länge und die dazugehörige Anzahl an Amplifikationszyklen ein.

Mit Hilfe von 20 unabhängigen Messungen in kinetischen PCR's wurde eine Amplifikationeffizienz beider Fragmente von ca. **0,96** ermittelt.

So ergibt sich für den Anteil der 4977bp-Deletion die folgende Formel (**Abb**.10):

$$f(\text{dmtDNA}) = A_{dmt} / A_{mt} * 1{,}9608^{\,Z_{mt}} / 1{,}9613^{\,Z_{dmt}} * 123/113$$

f(dmtDNA) = Frequenz der 4977bp-Deletion
Admt = Flächenintegral unter der Kurve des deletionsspezifischen Peaks
Amt = Flächenintegral unter der Kurve des wildtypspezifischen Peaks
Zdmt = Zyklenzahl der Amplifikation zur Detektion des Fragments der 4977bp-Deletion
Zmt = Zyklenzahl der Amplifikation zur Detektion des Fragments der intakten mtDNA

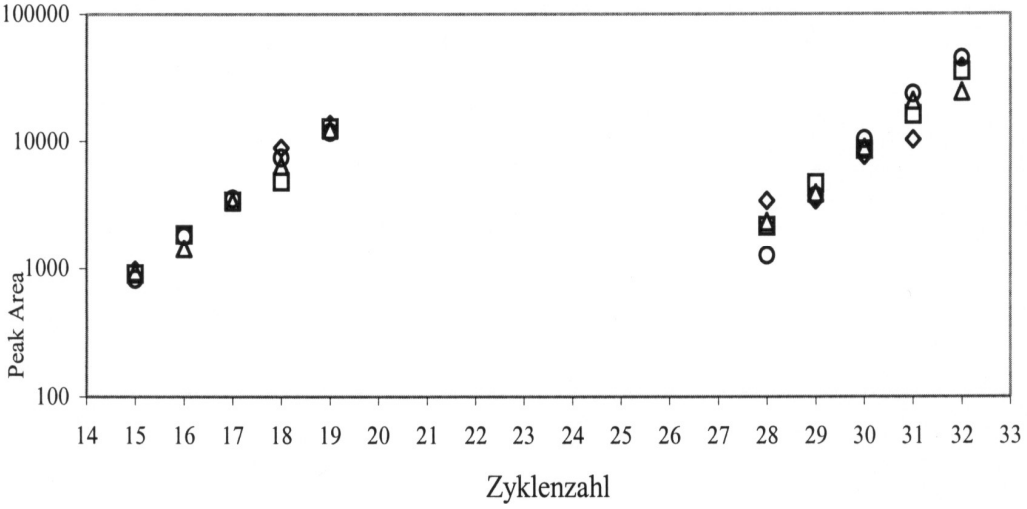


Abb.10: Exemplarische Darstellung der Zunahme des Amplifikationsproduktes für Wildtyp (links) und Deletion (rechts) bei vier unabhängigen Läufen mit je fünf Proben für Wildtyp und Deletion. Die Amplifikationseffizienzen für beide PCR- Produkte betrugen ca. 0,96.

3.4 Auswertung der verschiedenen Hirnabschnitte

Die folgenden Diagramme zeigen die Häufigkeit der 4977bp-Deletion der mtDNA in den fünf Hirnabschnitten in Abhängigkeit vom Alter. Aus den drei Einzelmessungen wurde der Median herangezogen, da die sogenannten „Ausreißer“ diesen weniger beeinflussen. **Abschnitt 1: *Substantia nigra***

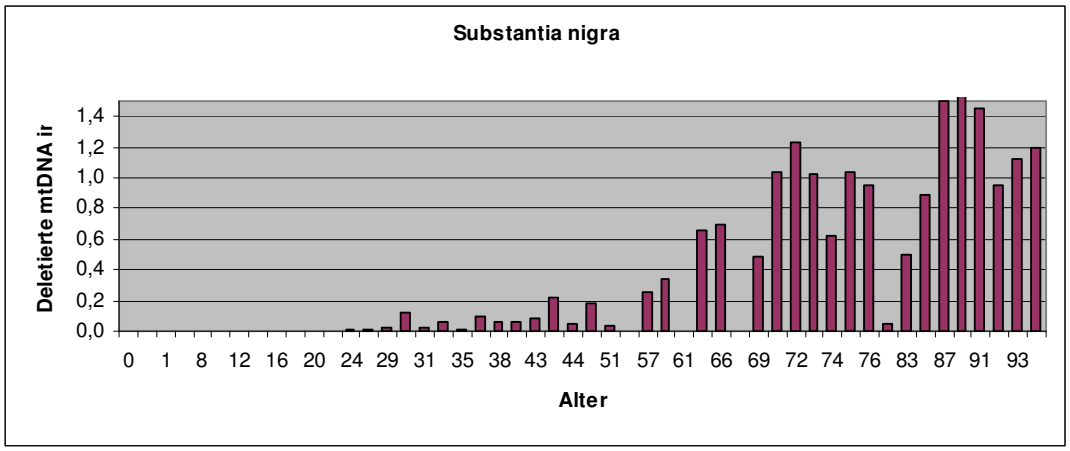


Abb.11: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich der *Substantia nigra*, dargestellt als Balkendiagramm. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

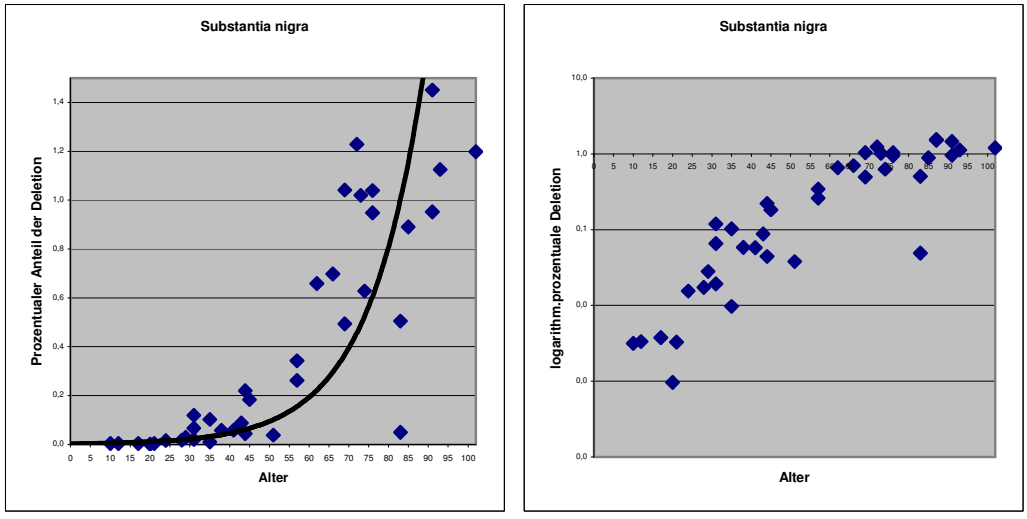


Abb.12/13: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich der *Substantia nigra*, dargestellt als Punktdiagramm mit interpolierter Trendlinie und als halblogarithmische Darstellung. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

Abschnitt 2: *Putamen*

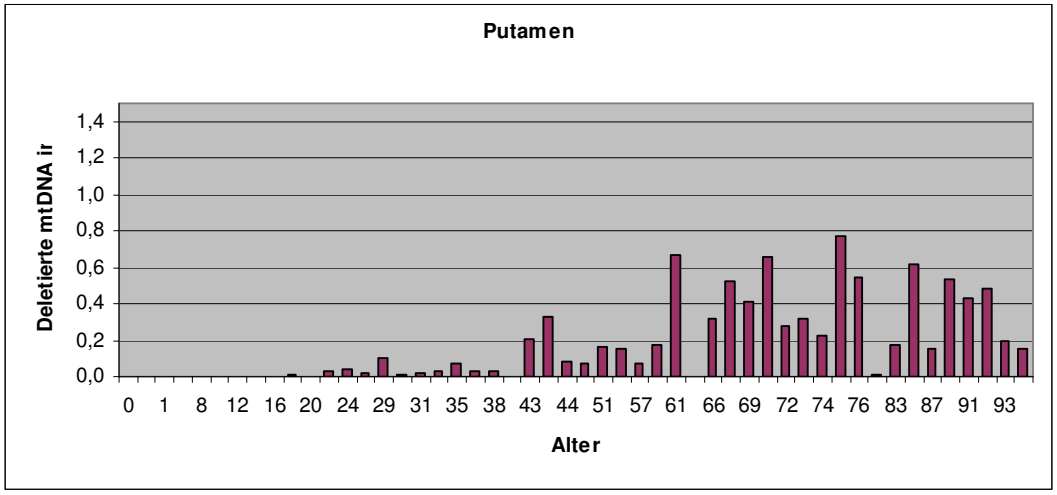


Abb.14: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *Putamen*, dargestellt als Balkendiagramm. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

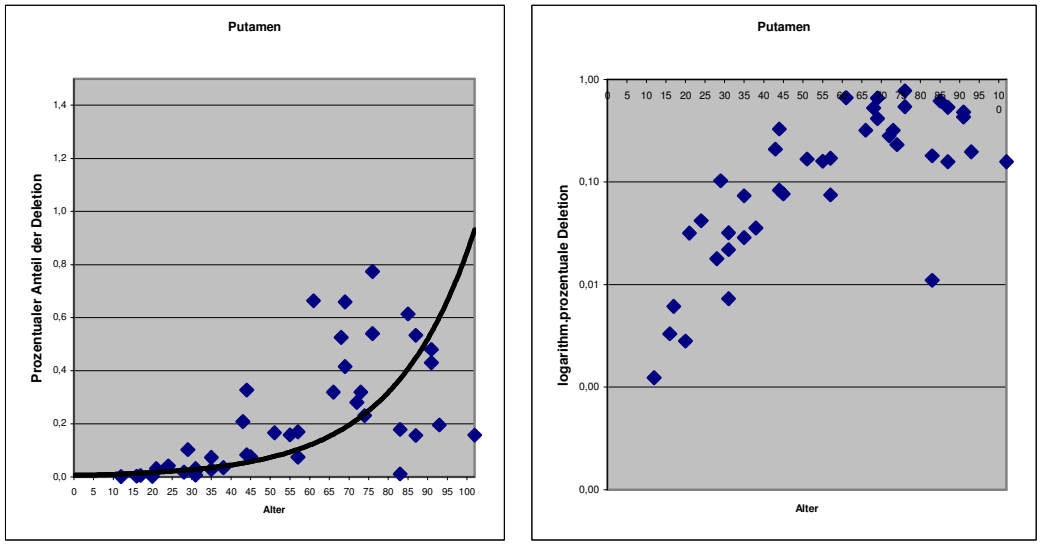


Abb.15/16: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *Putamen*, dargestellt als Punktdiagramm mit interpolierter Trendlinie und als halblogarithmische Darstellung. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

Abschnitt 3: *Nucleus caudatus*

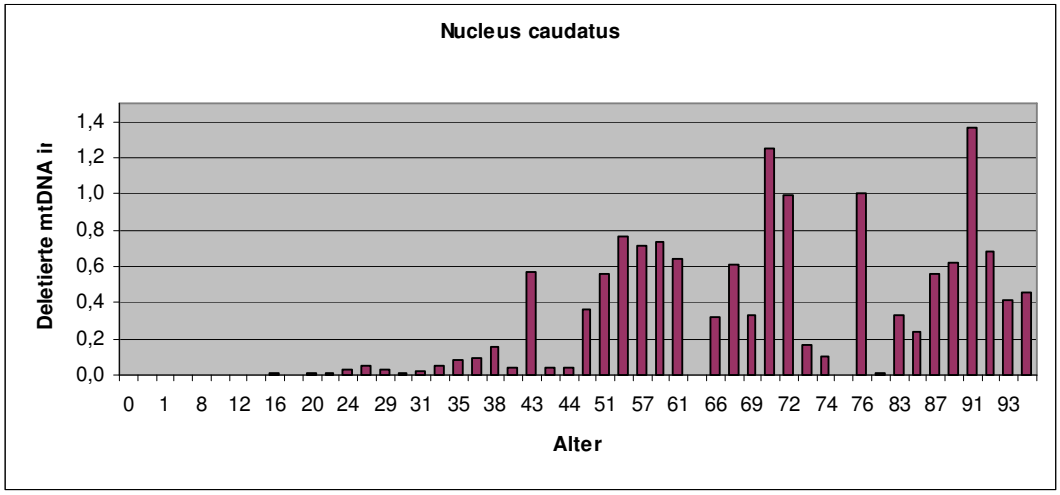


Abb.17: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *Nucleus caudatus*, dargestellt als Balkendiagramm. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

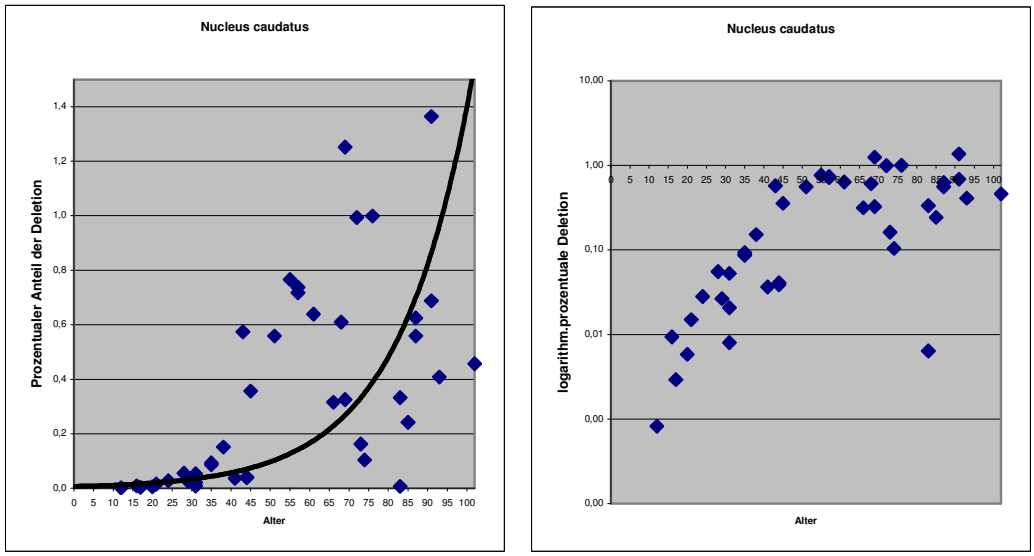


Abb.18/19: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *Nucleus caudatus*, dargestellt als Punktdiagramm mit interpolierter Trendlinie und als halblogarithmische Darstellung. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

Abschnitt 4: *Cortex cerebri* / Großhirn

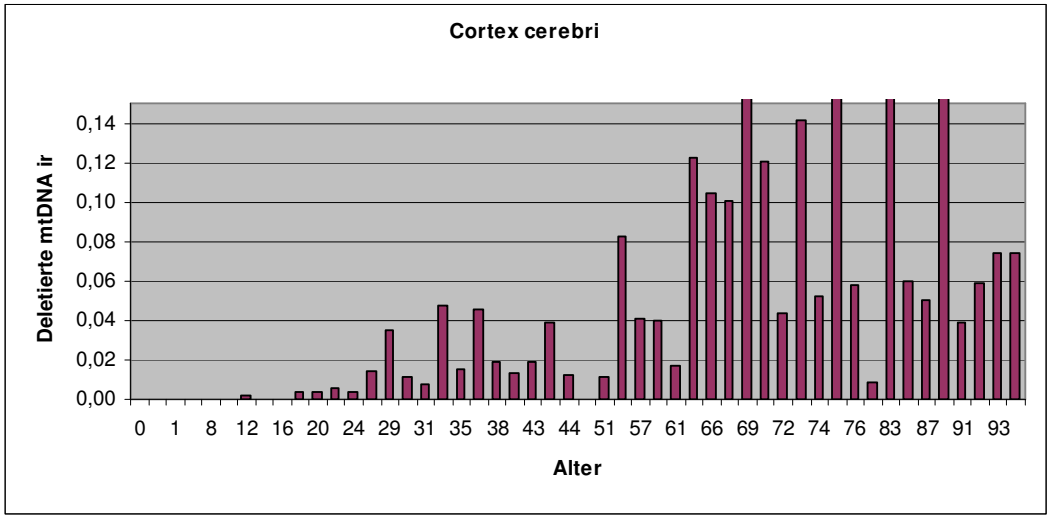


Abb.20: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *parietalen Cortex cerebri*, dargestellt als Balkendiagramm. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

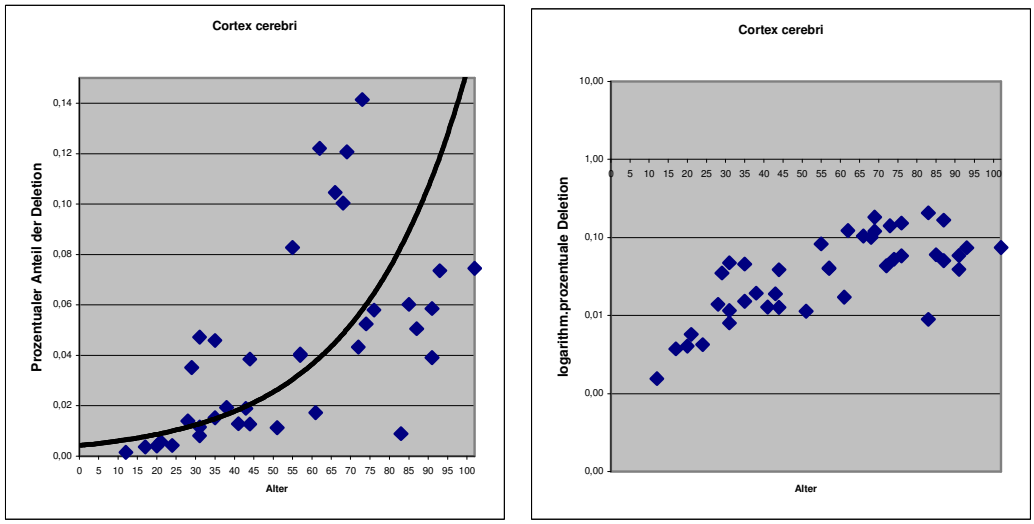


Abb.21/22: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *parietalen Cortex cerebri*, dargestellt als Punktdiagramm mit interpolierter Trendlinie und als halblogarithmische Darstellung. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

Abschnitt 5: *Cortex cerebelli* / Kleinhirn

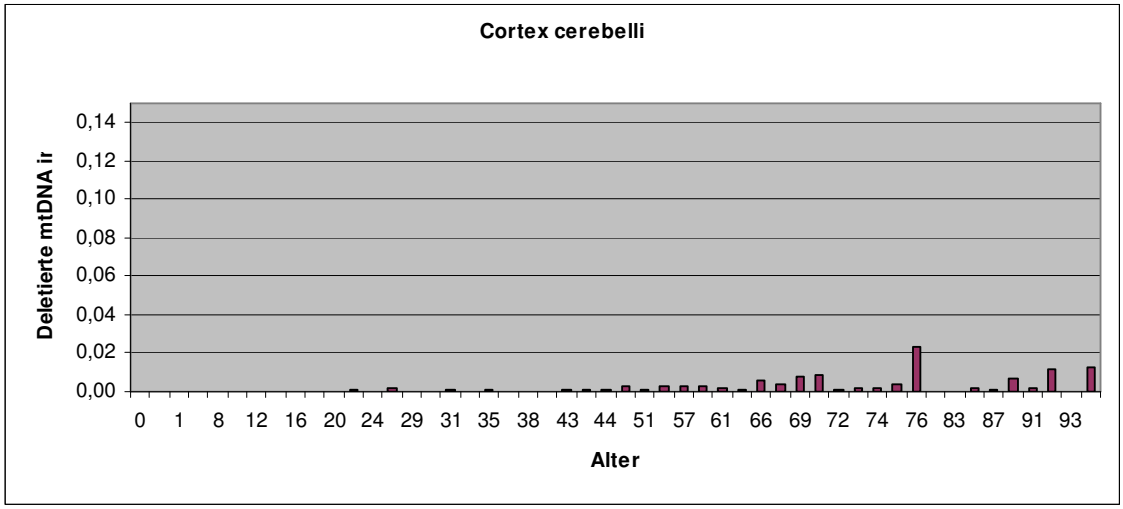


Abb.23: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *Cortex cerebelli*, dargestellt als Balkendiagramm. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

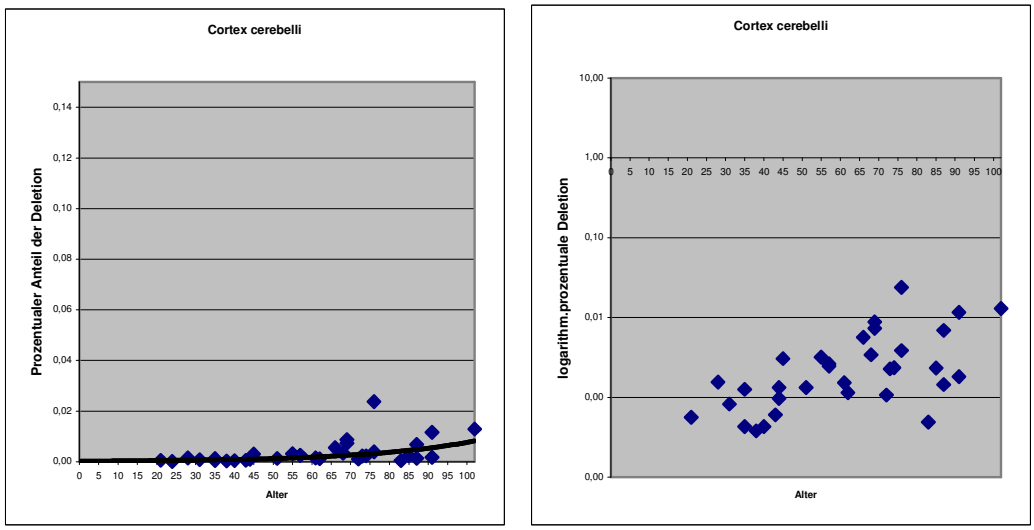


Abb.24/25: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des *Cortex cerebelli*, dargestellt als Punktdiagramm mit interpolierter Trendlinie und als halblogarithmische Darstellung. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

Abschnitt 6: Skelettmuskel (*Musculus iliopsoas*)

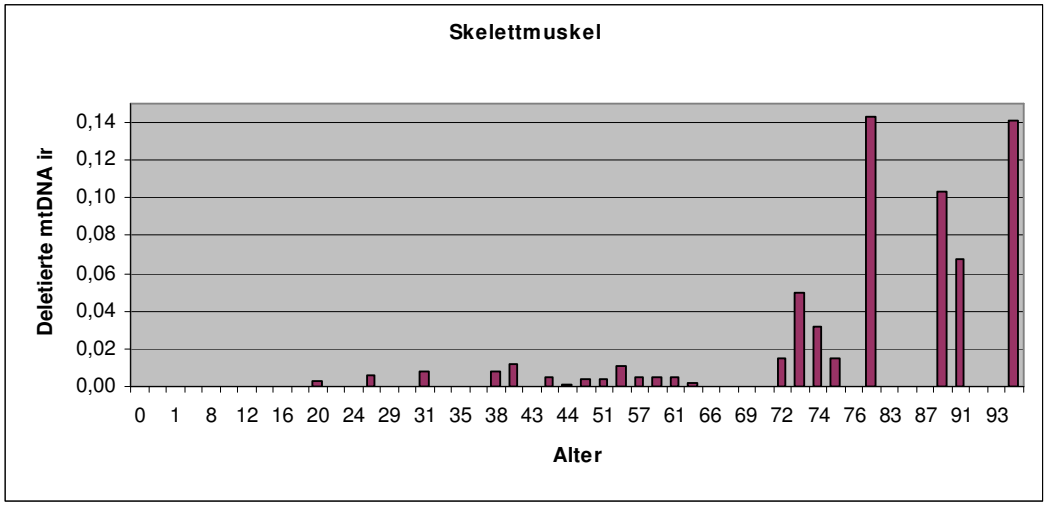


Abb.26: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des Skelettmuskel, dargestellt als Balkendiagramm. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

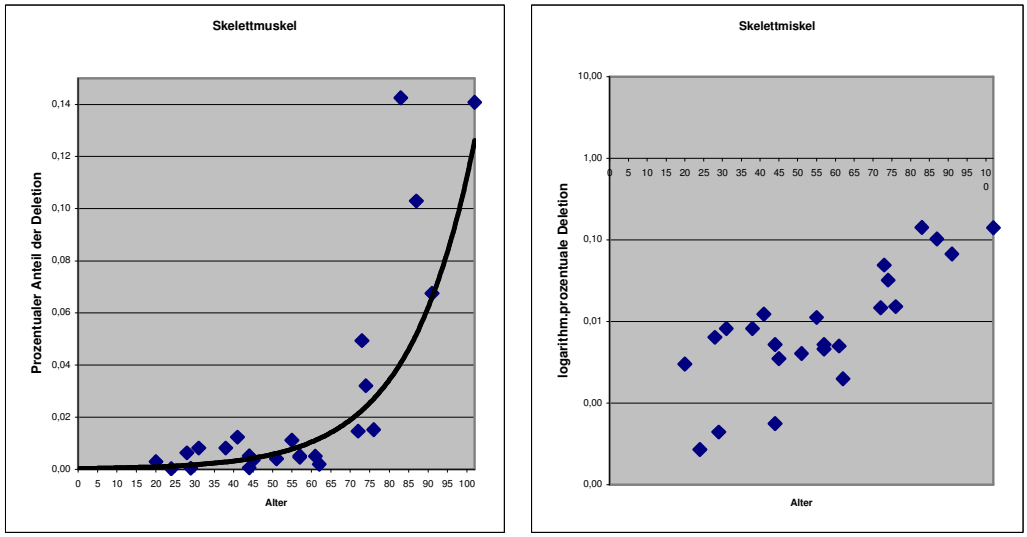


Abb.27/28: Zunahme der Akkumulation der 4977bp-Deletion im Bereich des Skelettmuskel, dargestellt als Punktdiagramm mit interpolierter Trendlinie und als halblogarithmische Darstellung. Es wurde der Median des prozentualen Anteils der Deletion in Relation zum Wildtyp (del/wt) aus bis zu sechs PCR-Läufen und anschließender Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer gegenüber dem Lebensalter aufgetragen.

3.5 Altersabhängigkeit der Akkumulation der 4977bp-Deletion bei akut zu Tode gekommenen Patienten

Wie in den Graphiken der Auswertung der verschiedenen Hirnabschnitte dargestellt, handelt es sich um eine annähernd exponentielle Funktionen. Nach Durchführung einer Regressionsanalyse (Probenpaare gemittelt) für die einzelnen Abschnitte wurde eine Regressionsgerade und der jeweilige nichtparametrische Korrelationskoeffizient „r" nach Spearman-Rho bestimmt (s Kap.2.5 Statistik und Auswertungsprogramme).

Der beste Korrelationskoeffizient wurde zwischen der Menge der Deletion und dem Lebensalter in der *Substantia nigra* mit r = 0,833 ermittelt. Es folgen *parietaler Cortex* mit r = 0,813, *Nucleus caudatus* mit r = 0,790 und *Putamen* mit r = 0,784, sowie das *Cerebellum* mit r = 0,672 (bei allen $p < 0,01$).

Die Messergebnisse lassen eine eindeutige (interindividuelle) Altersabhängigkeit der Akkumulation der 4977bp-Deletion in der *Substantia nigra*, dem *Putamen*, dem *Nucleus caudatus* und dem *Parietalcortex* erkennen. Im Kleinhirn war die altersabhängige Zunahme der *„common deletion"* zwar ebenfalls nachweisbar, doch lag hier der höchste prozentuale Wert der 4977bp-Deletion um den Faktor 100 deutlich niedriger.

Beim intraindividuellen Vergleich z.B. vom *Cerebellum* und den Basalganglien lag dort der Anteil an deletierter mtDNA bis zu 2000-mal höher. Im Vergleich zum *parietalen Cortex* lag in den Basalganglien ca. 20-100-mal mehr deletierte mtDNA vor.

Kein Nachweis von Deletionen ergab sich bei Individuen, die jünger als 10 Jahre zum Zeitpunkt ihres Todes waren. Im Kleinhirn konnte die Deletion erst ab einem Alter von 20 Jahren detektiert werden.

Die höchsten Deletionswerte waren bei Individuen im hohen Lebensalter in den Basalganglien mit einem prozentualen Deletionsanteil von ca. 1,5 % festzustellen. In der *Substantia nigra* wurde ein Wert von 2,23 % bei einem 55jährigen Individuum erreicht, bei einem 61jährigen sogar ein Wert von 2,81 %. Bei den gleichen Individuen lagen im *Nucleus caudatus* die Maximalwerte bei 2,14 % und 2,31 %. Die niedrigsten Werte wurden im *Cerebellum* mit maximal 0,02 % detektiert.

Die stärksten Schwankungen waren im *Nucleus caudatus* (3), der stetigste Anstieg in den Messungen in der *Substantia nigra* (1) zu erfassen.

Es scheint vor allem in der *Substantia nigra* (1) und im *Putamen* (2) im höheren Alter (70-80 Jahren) eine Art Sättigungskinetik vorzuliegen. Die Deletion stagnierte bei ca. 1,5 %, was durch die interpolierte Trendlinie graphisch erfasst werden konnte.

In dieser Arbeit diente das Gewebe des Skelettmuskels des *Musculus iliopsoas* als direktes „Vergleichsgewebe“. Hier lag der Anteil der Deletion zwischen dem des Großhirns und dem des Kleinhirns. Interpoliert kann man sagen, dass im Skelettmuskel ein Zehntel des relativen Deletionsanteils der zentralen Kerngebiete nachzuweisen war. Im Vergleich zum Kleinhirn lag dort jedoch die 10fache Menge vor.
Die in den Basalganglien und der *Sustantia nigra* beobachtete Sättigungskinetik scheint im Skelettmuskel nicht vorzuliegen.

4. DISKUSSION

Genau wie die vorgelegte Arbeit beschäftigen sich viele Forschungsgruppen mit dem Themenkomplex der Deletionen von mitochondrialer DNA in den postmitotischen Geweben. Dabei werden die Schwerpunkte allerdings unterschiedlich gelegt.
Auf der einen Seite werden die Grundlagen der Entstehung von mitochondrialen Deletionen und biophysiologischen Abläufen wie u.a. dem Energiefluss der Zelle und dem Altern untersucht. Andererseits liegt ein Themenschwerpunkt bei den klinischen Auswirkungen von pathophysiologischen Aberationen. Dies soll in den später folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert werden.

4.1 Überprüfung der Methode

In der vorliegenden Arbeit sollte die altersabhängige Zunahme der 4977bp-Deletion der mitochondrialen DNA untersucht werden. Dazu wurde im Vorfeld ein Patientenkollektiv von 50 akut verstorbenen Individuen ausgewählt, die an keinerlei ausschließenden Grunderkrankungen litten. Zu diesen gehörten chronische systemische (Leberzirrhose, Niereninsuffizienz), lokal cerebrale Ischämien (Traumata, Apoplex), massive exogene Noxen, bekannte Tumorleiden oder Erkrankungen, die allgemein mit der Produktion von Radikalen in Verbindung stehen (vgl. Merril et al., 1996).

4.1.1 Gewebeauswahl

Die fünf untersuchten exemplarischen Hirnabschnitte stammten von Individuen, die zum Zeitpunkt ihres Todes zwischen 3 Monaten und 102 Jahren alt waren. Die fünf topographisch unterschiedlichen Regionen des menschlichen Gehirns wurden, neben den interindividuellen Differenzen in Abhängigkeit zum Alter, intraindividuell bezüglich ihres prozentualen Anteils an deletierter mtDNA verglichen.

Diese wurden den Ergebnissen, die in anderen Arbeitsgruppen bei Individuen mit neurodegenerativen Erkrankungen erhoben wurden, gegenübergestellt. Die für diese Arbeit ausgewählten Hirnregionen, sind bei den verschiedenen Erkrankungen morphologisch oder funktionell betroffen.

Das *Cortex cerebri* stellt das betroffene Gewebe für den Morbus Alzheimer dar, die *Substantia nigra* ist beim Morbus Parkinson betroffen, im *Cortex cerebelli* findet sich häufig ein Korrelat für klinisch beschriebene Ataxien. Ferner wurde der *Nucleus caudatus* und *Putamen* ausgewählt, da diese Bereiche aufgrund der ständigen endogenen Schädigung durch freie Radikale eine enge Korrelation zum Lebensalter erwarten lassen. Zusätzlich zu den untersuchten fünf Abschnitten des humanen ZNS (s. Ergebnisteil) wurde als Referenz Gewebe des *Musculus iliopsoas* untersucht.

4.1.2 Optimierung der PCR

Es wurde eine Singleplex PCR durchgeführt, bei welcher man den Ansatz für das Wildtyp- und das Deletionsfragment parallel pipettiert und zeitgleich amplifiziert. Es wurden im Vergleich zu älteren Arbeiten *Primer*paare (Mit1F/2R u. Alt1F/2R) gewählt, die vergleichsweise kleinere Fragmente flankierten. Bei der undeletierten mtDNA waren es ein 113 bp-Fragment, bei der 4977bp-Deletion 123 bp-Fragment. So wurde die Ausbeute erhöht bzw. die Amplifikationseffizienz verbessert und die Spezifität der Gesamtreaktion gesteigert.

Das für den Nachweis der 4977bp-Deletion verwendete Protokoll von Lee et. al (1994) wurde für die eigene Quantifizierung modifiziert. Es wurde hierbei der Einfluss von stabilisierenden Additiven, wie TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) und DMSO (Dimethylsulfooxid) ermittelt (s. S.22). TMAC soll die Amplifikation AT- reicher Regionen fördern und kommt daher besonders für die, in unseren Versuchen entscheidende, mitochondriale DNA-Synthese in Frage (Chevet et.al, 1995). DMSO soll zur Auflösung störender Sekundärstrukturen innerhalb der Matrize den PCR-Ansätzen hinzugefügt werden, um die Ausbeute an Reaktionsprodukten zu erhöhen. Allerdings hat das Enzym hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Taq- Polymerase (Newton & Graham, 1994).

Die Wirkungsweise beider Substanzen ist bisher nicht eindeutig geklärt und sollte für jede PCR individuell ausgetestet werden (Newton & Graham, 1994). Bei der Amplifikation in unseren Versuchen, mit den markierten *Primern* für die Quantifizierung im ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer, konnte eine erhöhte Sensitivität

und Spezifität festgestellt werden. Die Spezifität der *Primer* zeigte sich darin, dass keine anderen Fragmente amplifiziert wurden. Die Sensitivität wurde durch die niedrige Nachweisgrenze und die deshalb geringere Zahl an Zyklen dargestellt, was mit einem verminderten Kontaminationsrisiko einherging.

Die Festlegung der Amplifikationszyklenzahl konnte in einem Vorversuch mittels einer TaqMan-Real-Time-PCR erfolgen. Es zeigte sich, dass sich die Amplifikation des 113 bp Fragmentes nach etwa 17 Zyklen und die des 123 bp Fragmentes nach etwa 28 - 32 Zyklen in etwa in der Mitte der exponentiellen Amplifikationsphase befinden und nicht in der Plateauphase, welche eine Quantifizierung unmöglich machen würde (vgl. auch Von Wurmb-Schwark et al., 2002).

4.1.3 Semiquantitative Auswertung

Vor der lasergestützten Sequenzierung der Amplifikate, wurden in einem vorgeschalteten Schritt die PCR-Produkte auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen. So konnten die eingesetzten Mengen an mtDNA optimiert werden. Das intakte mtDNA-Fragment konnte in den folgenden Messungen als interner Standard dienen.

Durch die Erstellung einer Eichgerade und mit der daraus formulierten Formel konnten eine prozentuale Angabe der Sequenzer-Messwerte des Wildtyp- und Deletions-fragmentes erfolgen. Zudem war ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen möglich.

Die Messung im ABI Prism™310 Genetic Analyzer nach der Amplifikation mit fluoreszenzmarkierten *Primern* hat sich als sehr genaue und sensitive Messung bewährt. Es war möglich Fragmentkonzentrationen bis zu 10 pg nachzuweisen. Außerdem bot diese Methode eine deutliche Arbeits- und Zeitersparnis im Vergleich zum Auftragen der Amplifikate auf Polyacrylamidgele. In einem Lauf konnten 48 Proben automatisch gemessen werden, wobei jede Einzelmessung ca. 20 min dauerte.

Es wurden bis zu sechs unabhängige Amplifikationen mit folgender Laserdetektion durchgeführt und aus mindestens dreien der Median ermittelt. Es konnte eine statistisch signifikante Altersabhängigkeit der 4977bp-Deletion in allen Geweben nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient lag bei fast allen Abschnitten zwischen $r = 0{,}672$ und $r = 0{,}833$. In den Untersuchungen von Liu et al. (1998) lag dieser niedriger, bei $r = 0{,}64$. Dies könnte durch die geringere Probenzahl und die nicht genauer spezifizierte Art des Muskelgewebes in der letzteren Studie erklärt werden.

4.1.4 Andere Quantifizierungsmethoden

In der Literatur werden noch weitere Möglichkeiten zur Quantifizierung mitochondrialer DNA-Fragmente beschrieben. Technisch erheblich einfacher stellt sich eine densitometrische Auswertung von angefärbten Banden auf Ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen dar. Eine genaue quantitative Auswertung ist jedoch nicht möglich, da die Intensität der Signale ab einer bestimmten Konzentration nicht mehr linear entsprechend der Amplifikatmenge zunimmt (Meissner et al., 1997, 2000).

Die serielle Verdünnung, ein semiquantitatives Verfahren, das mit verschiedenen Templateverdünnungen arbeitet, wurde von vielen Arbeitsgruppen zur Quantifizierung der 4977bp-Deletion angewendet (Lee et al., 1994; Ballinger et al., 1996).

Dieses Verfahren gilt als anfällig gegenüber äußeren Störungen, so dass ein interner Standard (20 bp unterschiedlich zum Fragment) zur Koamplifikation benötigt wird. Dieser gleicht eventuelle Differenzen zwischen den verschiedenen Ansätzen aus und stört nicht den exponentiellen PCR-Verlauf (Simonetti et al., 1992; Liu et al., 1998). Durch die ungleichen Quantifizierungsverfahren unterscheiden sich auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppen. So wies Lezza et al. (1999) bei der seriellen Verdünnung ein Deletionsanteil von 0,06 % und abweichend bei der kinetischen PCR einen Anteil von 0,2 % deletierter mtDNA in Skelettmuskel nach. Vergleichbare prozentuale Anteile lagen auch bei Corral-Debrinski et al. (1992) mit 0,1 % bzw. 0,00015 % im Herzmuskelgewebe vor. Eine Variationsbreite mit bis zu 100-fachen (0,005 % versus 0,5 %) Deletionsunterschieden konnten auch beim Vergleich von vier verschiedenen Quantifizierungsmethoden gezeigt werden (Zhang et al., 1997).

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Hamblet und Castora (1996), die ebenfalls die serielle Verdünnung mit der kinetischen PCR bei der Quantifizierung der 4977bp-Deletion in verschiedenen Hirnabschnitten einer 59jährigen Person verglichen, die aufgrund eines Lungenkarzinoms unter chronischer Hypoxie litt. Mittels der seriellen Verdünnung konnten zwischen *Nucleus caudatus* (1,41 %) und *Parietalcortex* (0,14 %) ein Unterschied um den Faktor 10 gezeigt werden, hingegen ergaben sich bei der kinetischen PCR höhere Werte (12,6 % und 3,2 %). Generell wurde bei diesem Verfahren ein erhöhtes Auftreten von Ausreißern beschrieben (Mehmet et al., 1998).

Die Streubreite der verschiedenen Quantifizierungsmethoden in den unterschiedlichen Arbeiten macht den direkten Vergleich der Ergebnisse mit dem hier angewandten Verfahren schwierig.

4.2 Intraindividuelle Unterschiede in den verschiedenen untersuchten Hirnabschnitten und dem Skelettmuskel

Das Vorkommen der 4977bp-Deletion in postmitotischen Geweben, wie z.B. Herz-, Skelettmuskulatur und Hirngewebe ist mehrfach in der Literatur dokumentiert (Hsieh et al., 1994; Yen et al., 1994; Meissner et al., 2008).

4.2.1 Anatomie und Physiologie der verschiedenen Hirnareale

Diese fünf verschiedenen untersuchten Bereiche des Gehirns stehen für verschiedene Funktionen innerhalb der Steuerung und des Zusammenspiels innerhalb der cortikalen Funktionen und mit dem Gesamtorganismus.

Die *Substantia nigra* ist ein subcortikales Kerngebiet, das eng mit dem *Thalamus* und den Basalganglien in Verbindung steht. Der *Nucleus caudatus* und das *Putamen* gehören zu den Basalganglien und bilden gemeinsam das *Striatum*, das Afferenzen vom *Cortex cerebri* und gegenseitige Verbindungen zum *Thalamus* und zur *Substantia nigra* unterhält.

Die Basalganglien und die *Substantia nigra* sind als Teil des extrapyramidalen Systems verantwortlich für die automatisierte Ausführung erlernter Bewegungen und dem Spracherwerb.

Die sogenannte graue Substanz entspricht dem *Cortex cerebri* und bedeckt die beiden Großhirnhemisphären. Sie ist für die Planung von beispielsweise komplexen Bewegungsabläufen und die gesamten kognitiven Vorgänge von zentraler Bedeutung.

Der *Cortex cerebelli* ist über die Kleinhirnkerne und *Pedunculi* mit dem Mittelhirn, der *Pons* und der *Medulla* verbunden. Es ist vor allem an der Steuerung und Koordination von Bewegungen beteiligt.

4.2.2 Intraindividuelle Unterschiede

In allen Abschnitten, außer dem *Cerebellum*, konnte eine deutliche Zunahme der 4977bp-Deletion der mtDNA mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Dies stimmt überein mit anderen Untersuchungen, in welchen besonders *Putamen* und *Substantia nigra* einen hohen Anteil an deletierter mtDNA aufwiesen. Übereinstimmend sind ebenfalls die Beobachtungen, das im *Cortex cerebri* geringere und im *Cortex cerebelli* fast keine Deletion nachzuweisen sind (Soong et al., 1992; Di Donato et al., 1993).

Beide Arbeitsgruppen und auch Arnheim & Cortopassi (1992) konnten im Kleinhirn einen solchen altersbedingten Anstieg nicht detektieren, wobei die Ursachen hierfür

kontrovers diskutiert werden. Einig ist man sich darüber, dass im *Cerebellum* gesunder Individuen besondere Schutzmechanismen wirken müssen. Im Kleinhirn kommt es z.B. im Alter nicht zum Aktivitätsverlust der Mn-abhängigen Superoxiddismutase (Cardozo-Pelaez et al., 1999). Es zeigte sich jedoch bei Ratten ein Anstieg der Menge der Deletion im Kleinhirn beim Überschreiten eines „Schwellenwertes" nach prolongierten ischämischen Ereignissen. Diese Ansicht konnte in anderen Arbeiten bestätigt werden (Meißner et al., 2000).

Die topographisch unterschiedliche Verteilung deletierter mtDNA im menschlichen Gehirn scheint das Ergebnis von verschiedenen biochemischen und (patho-) physiologischen Konstellationen zu sein. So können z.B. die metabolische Aktivität und die daraus folgende Produktion von ROS in kortikalen Regionen und den Basalganglien höher als im *Cerebellum* sein. Andererseits sind dort mehr Neuronen enthalten als in den anderen Abschnitten des ZNS (Soong et al., 1992).

Vergleichsweise konnte auch in den verschiedenen Hirnabschnitten von Mäusen eine unterschiedliche Verteilung der Deletion nachgewiesen werden. So konnte der Marker für oxidative Schäden der DNA, die erhöhte Konzentration von 8-OH-dG, im *Nucleus caudatus*, *Putamen* und *Hippocampus* nachgewiesen werden. Hingegen waren nur geringe Spiegel im Kleinhirn und der Hirnrinde zu finden (Soong et al., 1992; Browne et al., 1997; Polidori et al., 1999).

Sowohl die 4977bp-Deletion als auch die oxidativen Schäden (8-OH-dG) der mtDNA zeigen im menschlichen Gehirn eine mehr als 10fache Zunahme (Mecocci et al., 1994). In der Hirnrinde bewegt sich der Anteil der deletierten mitochondrialen DNA zwischen 0,023 und 3,4 %, im *Putamen* von 0,16 bis 12 %. Hier ergab sich ein etwa 100facher Unterschied, während im Kleinhirn kein Nachweis zu führen war (Soong et al., 1992; Corral-Debrinski et al., 1992).

Im Moment scheint es sicher zu sein anzunehmen, dass Deletionen und auch Punktmutationen gewebespezifisch sind und die Mutationshäufigkeit und die Akkumulationsrate eher von den Gewebeeigenschaften als von molekularen Mechanismen auf zellulärer oder subzellulärer Ebene abhängen (Meissner et al., 2006; Meissner, 2007).

4.2.3 Andere Indikatoren für oxidative Schäden

Das durch freie Radikale hydroxylierte Nukleotid 8-OH-dG kann als Indikator oder Marker für oxidative Schäden dienen. Dies wurde allerdings von Zullo et al. (1999)

gegensinnig beurteilt, da eine antiproportionale Zunahme von 8-OH-dG bei geringerem Deletionanteil im Frontallappen und im *Putamen* betrachtet wurde. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen chronischer Hypoxie, erhöhter Akkumulation der 4977bp-Deletion und der Reduktion der 8-OH-dG Konzentration im menschlichen Gehirn beschrieben (Zullo et al., 1999; auch in Bohr et al., 2002).

Die Zusammenhänge zwischen oxidativen Schäden durch ROS, der 4977bp-Deletion, dem Elektronenleck und der 8-OH-dG Konzentration untersuchte auch die Arbeitsgruppe von Wei et al. Sie stellten gleichzeitig auch eine Verbindung zur Größe der Mitochondrien und enthaltener mtDNA-Menge, also das Mitochondrium als eine Art Biosensor, dar (Wei & Lee, 2001, 2002).

Soong et al. (1992) beobachteten bei einer Studie mit 6 Patienten mittels serieller Verdünnung in der *Substantia nigra* eine Korrelation (r = 0,94) von oxidativen Schäden und mtDNA Deletionen, erhielten sonst aber relativ inkonstante Ergebnisse. Als Erklärungsansatz für die höchsten Anteile der *„common deletion“* in den Basalganglien lässt sich folgender Ansatz diskutieren:

Die Neurone der humanen *Substantia nigra*, welche das *Striatum* (*Nucleus caudatus* und *Putamen*) innervieren, enthalten viel aus Dopaminderivaten aufgebautes Neuromelanin, das in Zellen mit hoher Catecholaminoxidation typisch ist. Das Dopamin wird durch das in der äußeren Mitochondrienmembran gelegene Enzym Monoamin-Oxidase B (MAO-B) oxidiert, hierbei kann gleichzeitig vorhandenes Wasserstoffperoxid in das hochreaktive Hydroxylion umgewandelt werden. Ebenso kommt es zu einem hohen Anteil an deletierten mitochondrialen Genomen im *Nucleus caudatus*, was auch auf die Aktivität des Enzyms MAO-B zurückgeführt werden kann. Diese nimmt wie die Eisenablagerungen im Alter zu (Soong et al., 1992). Die hohe MAO-B Aktivität und ein hoher Eisengehalt verstärkten die Radikalproduktion in der Fenton-Reaktion. Als Cofaktor für diese Prozesse werden Eisenionen (Fe^{3+}) benötigt. Diese akkumulieren altersabhängig in den genannten Hirnabschnitten. Das Fe^{3+}-Ion ist im Übrigen in der Lage, in der Fenton-Reaktion H_2O_2 in OH- zu verwandeln und damit weitere DNA-Schäden zu induzieren (Walter et al., 2002).

Der *Nucleus caudatus*, das *Putamen* und die *Substantia nigra* sind aufgrund dieser Mechanismen oxidativen Schäden im besonders hohen Maß ausgesetzt. Chen et al. (1995) stellten die Hypothese auf, dass die 4977bp-Deletion für einen bestimmten Zelltyp spezifisch ist (z.B. dopaminerge Neurone), während cholinerge oder GABAerge Neurone weniger Deletionen enthalten.

4.2.4 Vergleich mit Muskelgewebe

Die Häufigkeit der mitochondrialen Deletion im Referenzgewebe Skelettmuskulatur lag zwischen der des Nervengewebes und der der Muskulatur des Herzens. Lokale pathophysiologische Bedingungen wie Ischämie und Reperfusion könnten im Vergleich zur altersgleichen Kontrollperson zu einer deutlich vermehrten Akkumulation der *„common deletion"* führen (Meissner et al., 1999, 2001; Chabi et al, 2005).

Nervengewebe, Skelett- und Herzmuskulatur gehören zu den postmitotischen Geweben und sind, wie im Folgenden näher erläutert, stärker von der Akkumulation der mtDNA-Deletionen betroffen als sich reproduzierende Gewebe wie z.B. Leber, mit allen pathophysiologischen Folgen wie z.B. Funktionsstörungen in der Atmungskette (Kwong & Sohal, 2000). Doch gibt es auch sich lebenslang teilende Gewebe, wie z.B. Astrozyten im ZNS, die genau wie Neuronen dazu neigen mitochondriale Deletionen anzuhäufen (Storm et al., 2002).

4.3 Die Altersabhängigkeit der 4977bp-Deletion

4.3.1 Altersabhängige Akkumulation

Die Bedeutung der mtDNA- Schädigung für den Alterungsprozess ist nach wie vor nicht abschließend geklärt (Biesalski, 2002; Sastre et al., 2003).

Die Detektion der Deletion bei Personen unter 20 Jahren steht im Gegensatz zu den meisten in der Literatur angegebenen Ergebnissen (Yen et al., 1994; Hsieh et al., 1994). Das Auftreten der 4977bp-Deletion bei gesunden Personen wird dort als spontane somatische Mutation angesehen, welche dann mit zunehmendem Alter akkumuliert. Dieses könne dann frühestens bei den 20 – 30 jährigen nachgewiesen werden (Wei, 1998; Ozawa, 1999).

Sicher ist, daß die Nachweisgrenze für die Deletion u.a. von den verwendeten *Primern* abhängig ist. Durch den Einsatz des hier verwandten *Primer*paares, das sich als sensitiver als andere *Primer*kombinationen erwiesen hat und das durch das gebildete „kürzere" Amplifikat auch eine höhere Amplifikationsausbeute gewährleistet, sind bereits geringere Mengen an Deletion nachweisbar. Die Nachweisgrenze rückt dann folglich vom jungen Erwachsenenalter bis ins Jugend- bzw. Kindesalter vor. Der Nachweis von Deletionen auch im Kindesalter ist durch eine „maternal line study" an Leukozyten eines größeren Kollektivs (n = 71) mittels hochsensitiver PCR belegt (Thayer et al., 2003).

Eine Aussage über das genaue Alter des Gewebes bzw. des Individuums anhand des gemessenen 4977bp-Deletionsanteils der mtDNA zu treffen ist jedoch schwierig.
Die interindividuelle Streubreite in den Messwerten für den relativen prozentualen Anteil der Deletion, also der Akkumulation, wurde sowohl in den verschiedenen Arealen als auch in den verschiedenen Altersgruppen beobachtet, wie gleichsinnig auch in diversen anderen Arbeiten beschrieben wurde. Fraglich bleibt, ob ein erheblich größeres Patientenkollektiv genauere „Norm"- Werte liefern könnte.
Folglich kann eine Schätzung des Lebensalters zum Zeitpunkt des Todes mit diesem Verfahren nur mit Einschränkung gemacht werden kann. Erschwerend hinzu kommt noch die bereits im Ergebnisteil beschriebene Sättigungskinetik, die vor allem in den zentralen Kerngebieten ab dem ca. 70 Lj. deutlich wird. Vor allem in der halblogarithmischen Darstellung ist erkennbar, dass es eine Art Maximalgrenze an detektierter deletierter mtDNA zu existieren scheint. Ein relativer Anteil von ca. 3 % deletierter mtDNA wurde als „Schwellenwert" in diesen Messungen nicht überschritten. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen könnte die durch übermäßige Funktionsstörungen des Energiehaushaltes vermehrt induzierte Apoptose sein (s. 4.4.4).
Neuere Studien ordnen zufällig aufgetretenen, clonal vermehrten Punktmutationen eine wichtigere Rolle im Alterungsprozess ein. Diese treten auch schon im Kindes- und Jugendalter auf, wie Einzelzellexperimente zeigen konnten (Taylor et al., 2003).
In der Regel erzeugt eine mtDNA- Mutation eine intrazelluläre Mischung von normaler und mutierter DNA. Während der Mitose und Meiose werden die Wildtypen und die Mutante zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Das Resultat ist eine große Variabilität an Geno- und Phänotypen. Die Art der Mutation und der Prozentsatz deletierter mtDNA bestimmen neben den funktionellen Wildtypen das Ausmaß der phänotypischen Veränderungen, die erst ab einem gewebsspezifischen Schwellenwert sichtbar werden (Moraes et al., 1989; Lee et al., 1997).
Es stellt sich die Frage, inwieweit es sinnvoll ist, die Untersuchung des biologischen Alterns auf eine einzelne Deletion der mtDNA zu beschränken. Vielmehr müsste eine Vielzahl von mtDNA-Deletionen oder eben auch clonal vermehrter Punktmutationen untersucht werden.
Schädigungen der mitochondrialen DNA hängen, wie zuvor beschrieben, von einer Vielzahl endo- und exogener Faktoren ab. Folglich scheint die Konzentration der deletierten mtDNA eher als ein Hinweis auf das **biologische Alter** des Organismus oder Einzelorgans als auf das eigentliche Lebensalter zu fungieren.

Außerdem ist zu beachten, dass gezielte Untersuchungen der mtDNA-Veränderungen in den verschiedenen Geweben nur den momentanen Status reflektieren können.
Damit kann die 4977bp-Deletion der mtDNA als stochastisches Phänomen betrachtet werden, so dass routinemäßige Untersuchungen der *„common deletion“* wohl allenfalls einen zusätzlichen Hinweis im Rahmen makroskopischer und histologischer Analysen ergeben. Die Rolle eines Biomarkers für den Alterungsprozess ist jedoch experimentell belegt. Der Nachweis der *„common deletion“* kann zumindest dazu dienen, eine grobe Einordnung in eine Altersgruppe vorzunehmen.

4.3.2 Alterungstheorien

Es gibt heute über 300 Theorien über den Alterungsprozess, von denen einige konkurrieren oder einander ausschließen, viele sich allerdings gegenseitig ergänzen oder voneinander unabhängige Formen des Alterns beschreiben. Grob können sie einerseits in vorprogrammierte Prozesse, die zu Veränderungen der Genexpression mit verminderter Lebensfähigkeit führen und andererseits in zufällige Schädigungen von Makromolekülen wie z.B. Deletionen oder Punktmutationen, deren Akkumulation ein Altern bedingen kann, unterteilt werden (Arnheim & Cortopassi, 1992; Cortpassi et al., 1999; Meissner, 2007).
So wird z.B. in der mitochondrialen Theorie des Alterns (*free radical theory of aging*) postuliert, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Hauptverursacher einer Akkumulation der mtDNA-Aberrationen in den verschiedenen Geweben anzusehen sind. MtDNA-Veränderungen, wie größere Deletionen, führen zu Defiziten in der Energieversorgung und zur fehlerhaften Expression der von ihnen codierten Proteine der Atmungskettenkomplexe. Durch die Beeinträchtigung der Komplexe der Atmungskette kommt es zur weiteren Produktion von ROS, wodurch ein „*Circulus vitiosus*“ mitochondrialer Zerstörung entsteht (Wei et al., 2001; Sastre et al., 2003).
Die Rolle der ROS mit ihrer räumlichen Nähe zur Atmungskette muß jedoch aufgrund neuerer experimenteller Daten hinterfragt werden, denn z.B. Superoxide fügen Makromoekülen nur geringen Schaden zu, da das Anion die Zellmembran nicht durchdringen kann und durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Hydrogenperoxid abgebaut werden kann. Dies hat ein relativ niedrigeres mutagenes Potential und wird durch Glutathionperoxidase und Katalase entfernt (Wiesner et al., 2006).
Die *free radical theory of aging* besagt weiterhin, dass den Zellen der betroffenen Gewebe immer weniger Energie zur Verfügung steht, so dass der Stoffwechsel immer

mehr vermindert wird. Dadurch altern diese Zellen, Gewebe und Organe. Zusammengefasst: „Mit steigendem Alter akkumulieren mitochondriale Mutationen, dies führt zum Funktionsverlust der Mitochondrien und letztlich zum Zelltod“ (Cortopassi et al., 1999; Biesalski, 2002).

Diesen Zusammenhang unterstützt die (1956) von Harman entwickelte Theorie des Alterns. Seine Erklärung ähnelt der Verschleißtheorie. In dieser basiert das Altern auf dem Mangel an Energiebereitstellung eines Organismus durch die Akkumulation von mtDNA-Defekten (Harman, 1956; Miquel, 1998; Biesalski, 2002).

Obwohl menschliche Zellen verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Systeme entwickelt haben, welche die reaktiven Verbindungen und Radikale abwehren, scheint ein Teil der Moleküle diese Abwehrmechanismen zu umgehen und passagere oder dauerhafte Schäden an zellulären Bestandteilen, wie Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden und Membranen zu verursachen (Harman, 1992 et 2006; Sastre et al., 2003).

Diese Theorie wird durch eine Vielzahl von Hinweisen belegt:

Im Tierreich zeichnen sich Tiere mit hohen Stoffwechselraten (z.B. Mäuse), die also einen hohen Umsatz an Sauerstoff haben und analog viele ROS produzieren, durch eine relativ kürzere Lebenserwartung aus, als Arten mit einer geringeren Umsatzrate (z.B. Elefanten, Schildkröten). Es konnte der Zusammenhang zwischen einer deutlichen Lebensverlängerung bei Mäusen bei Drosselung des Stoffwechsels mittels einer Kaloriendiät nachgewiesen werden (Lee et al., 1999).

Konsekutiv mit der Akkumulation von Deletionen wird, wie bereits beschrieben, ein bioenergetisches Defizit mit ansteigendem Alter beobachtet. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte eine Abhängigkeit zwischen dem Ausmaß an mt-Deletionen und abnehmender Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase (Kopsidas et al., 2000). Ein Zusammenhang zwischen der akkumulierten 4977bp-Deletion und einem deutlichen Aktivitätsrückgang der Komplexe I, II und IV der Atmungskette wurde ebenfalls nachgewiesen (Lezza et al., 1999).

Auch im Alterungsprozess bei Ratten konnte im Gehirn eine deutliche Abnahme in der Funktion der Atmungskettenkomplexe I,II und IV abgeleitet werden. Ebenso zeigte sich eine selektive Vulnerabilität gegenüber fokalen Ischämien, welche insbesondere die Aktivität des Komplexes I minderten. Der Komplex III ist bei den Altersveränderungen am wenigsten betroffen, da dieser nahezu vollständig von nukleärer DNA kodiert wird (Cortopassi, 2002).

In seiner reduktiven „survival of the slowest theory“ postuliert de Grey (1997): „Wenn die Schädigung des mitochondrialen Genoms einen Schwellenwert erreicht, kommt es zu einer verringerten metabolischen Aktivität der Mitochondrien. Durch die so reduzierte ROS-Entstehung werden die mitochondrialen Membranen weniger geschädigt und der lysosomale Abbau der Zellorganelle bleibt aus. Als Folge kommt es zu einer schnellen Zunahme deletierter mtDNA im postmitotischen Gewebe. Dieser Mechanismus erklärt auch die von einigen Autoren beobachtete Abnahme von 8-OH-dG in stark oxidativ geschädigten Geweben (z.B. Zullo et al., 1999) oder bei Patienten mit Morbus Alzheimer (vgl. Lezza et al., 1999).

Im Gegensatz zu de Grey’s (1997) Theorie beobachtete u.a. Lu et al. (1999) eine altersabhängige Zunahme der 4977bp-Deletion, der 8-OH-dG Menge und des Maleindialdehydspiegels, eines Fettstoffwechselendproduktes in der Haut, während gleichzeitig die Aktivitäten der Schutzenzyme, wie der Cu- und Zn-Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase, mit dem Alter sanken.

Andere Autoren führten aus, das akkumulierte Deletionen für die Arbeit der Mitochondrien wichtige Gene in der Translation oder Funktion stören, so dass die Struktur und Stoffwechselabläufe der Mitochondrien zerstört werden und dass es in Form einer Kettenreaktion („Katastrophentheorie“, (Ozawa, 1999)) zur Entkopplung und zum endgültigen Funktionsverlust der Atmungskette kommt (Hsieh et al., 1994; Porteous et al., 1998; Lee et al., 1999).

Außer der *„common deletion“* deletion gibt es noch eine Vielzahl spezifischer Deletionen oder anderer Mutationen, die mit zunehmendem Alter akkumulieren und interessanterweise alle in Korrelation mit der Zunahme von 8-OH-dG stehen. Arnheim & Cortopassi beschrieben (1992) die 4977bp-Deletion deswegen als die „Spitze des Eisberges“.

Neuere Ergenisse entfernen sich ebenfalls von der klassischen *free radical theory of aging*. Es wurden anhand von Einzelzellexperimenten und Computermodellen schon frühzeitig im Leben aufgetretene zufällige Punktmutationen festgestellt, die sich dann im Laufe des Lebens klonal vermehrten (Taylor et al., 2003). Auf diese zellspezifische Art der Vermehrung von Mutationen/Deletionen wurde auch in vielen anderen Studien hingewiesen, untersucht wurden u.a. Gewebe der *Substantia nigra* (Bender et al., 2006; Kraytsberg et al., 2006), Skelettmuskelgewebe (Rasmussen et al., 2003; Chabi et al., 2005) und Muskelfasern (Bua et al., 2006). Die Menge der deletierten Moleküe variierte zwischen wenigen Dutzend und bis zu 100%. Eventuell spiegeln die Unterschiede die

verflossene Zeit zwischen dem Auftreten des zugrunde liegenden Kopierfehlers und dem Messzeitpunkt wieder. So scheint es, dass der absolute Anstieg der mtDNA-Mutationen eher von einer intrazellulären Expansion kommt als das unabhängige Deletionen in verschiedenen Zellen akkumulieren (Meissner, 2007).

Bei Tierexperimenten mit sogenannten *Mutator*-Mäusen wurde die Rolle der ROS im Alterungsprozess ebenfalls neu diskutiert. Den Mäusen fehlt das Reparaturenzym Polymerase γ (POLG), sodass gehäuft Punktmutationen auftreten Die Mäuse zeigen Symptome einer verfrühten Alterung. Interessanterweise sind trotz der hohen Mutationsbelastung keine Zeichen einer erhöhten oxidativen Schädigung, wie oxidierte Proteine, Lipide oder Nukleotiden (8-OH-dG) nachzuweisen. Dies widerspricht dem *Circulus vitiosus* von ROS-Schädigungen der Atmungskette, der darurch erhöhten Neubildung u.s.w. (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2005). Man sollte jedoch beachten, das eine hohe Anzahl von Punktmutationen (bis zu 1 von 1000bp) verdächtig ist, die mitochondriale Funktion zu beeinträchtigen. Mutationen, gleich welcher Art, stören in einem intronfreien mtDNA-Molekül die fehlerfreie Proteinsynthese und –faltung und führen zwangsläufig zu einer Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung an der Atmungskette (Meissner, 2007). Im Moment erscheint es daher denkbar das speziell die Deletionen die Energieversorgung nur auf Einzelzellniveau beeinträchtigen. Ein Deletionsanteil von mehr als 60% bis zu 90% in einer Zelle kann die Apoptose einleiten, welche in der nukleären DNA-Zerstörung gipfelt und zum Zelltod führt (vgl. 4.4.4). Zellen die mutierte mtDNA enthalten sind anfälliger für die Apoptose (Kujoth et al., 2007). Bei den weiterhin noch nicht abschließend betrachteten Kausalitäten vom Phänomen Alterung sind akkumulierte Deletionen wohl eher als ursächlich für ROS-Produktion und deren Einfluss auf die mitochondriale Funktion und klonal vermehrte zufällige Punktmutationen als Folge anzusehen (Meissner, 2007).

Eine ebenfalls gut erforschte sehr populäre Alterungstheorie ist die Telomertheorie. Neuere Studien ergaben einen theorieübergreifenden Erklärungsansatz für Alterungsprozesse. Nach einer neueren herausragenden Studie können mitochondriale Dysfunktionen, die mit einer erhöhten Produktion von ROS einhergehen oder auch diese bedingen, in humanen diploiden Fibroblastenkulturen zur vermehrten Verkürzung von Telomeren führen (Passos et al., 2007).

4.4 Der Zusammenhang der 4977bp-Deletion mit Hypoxie

4.4.1 Pathophysiologische Folgen chronischer Hypoxie

Das Gehirn ist besonders empfindlich gegenüber mangelnder Sauerstoffversorgung, die einerseits als akute cerebrale Ischämie mit oder ohne darauf folgender Reperfusion bei z.B. einem embolischen Gefäßverschluss oder einem Trauma auftreten kann.

Andererseits gibt es chronische Hypoxien durch systemische Erkrankungen, wie bei der koronaren Herzkrankheit oder beispielsweise Anämien, wobei mitochondriale Schäden durch den Energieabfall und die zusätzliche Radikalbildung zu Störungen in der Membranintegrität führen. Im Übermaß kann die Kapazität der zelleigenen Abwehrmechanismen überstiegen werden (Merril et al., 1996; Englander, 1999).

Wie bereits ausführlich beschrieben haben die reaktiven Sauerstoffspezies einen schädigenden Einfluss auf die Enzyme der Atmungskette und somit auf den Energiestoffwechsel und folglich auf die Proteinsynthese von z.B. Antioxidantien (Wei et al., 2002).

Merril et al. (1996) hatten die Menge der 4977bp-Deletion im *Putamen* und *frontalem Cortex* von 19 Patienten mit chronischer Hypoxie vergleichend quantifiziert und mit den Ergebnissen von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Es konnte in beiden Hirnabschnitten eine positive Korrelation zwischen deletierter mitochondrialer DNA und ischämischen Zuständen gezeigt werden.

Die gravierendsten Veränderungen im Gewebe wurden aber in der auf die Ischämie folgenden Reperfusion beobachtet. Die Beteiligung von ROS als molekulare Ursache der durch Reperfusion bedingten Gewebeschäden gilt als gesichert (DiLisa et al., 1998).

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bei exemplarischen Fällen mit bekannter chronischer cerebraler Hypoxie eine genauere neuropathologisch makroskopische und histologische Untersuchung durchgeführt. Makroskopisch imponierte die Nekrose von Neuronen in Form der für cerebrale Infarkte typischen Kolliquationsnekrose. Diese traten in unterschiedlichem Ausmaß fokal oder generalisiert im gesamten Gehirn auf. In der Histologie zeigte sich eine Aktivierung bzw. Proliferation der Astrozyten und Mikroglia. Ebenso konnte ein Verlust von Purkinjezellen nachgewiesen werden. Es konnte in einigen Beispielen gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen dem Auftreten dieser histopathologischen Veränderungen und dem Nachweis von mitochondrialer Deletionen vor allem in den Proben des *Cerebellum* vorliegt (vgl. Meissner et al., 2000).

Drei der in dieser Arbeit untersuchten Proben stammten von Individuen, die am sogenannten „Sudden Infant Death syndrome“ (SIDS) verstarben, bei welchem ebenfalls ein Zusammenhang mit cerebraler Hypoxie diskutiert wird. Hier konnte in keinem Hirnabschnitt die 4977bp-Deletion nachgewiesen werden. Allerdings gelang bei den juvenilen Individuen generell erst ein Nachweis jenseits des 10. Lebensjahres, was deutlich über dem Alter der durch SIDS gefährdeten Säuglinge (<1 J.) liegt.

4.4.2 Vermehrte Akkumulation der 4977bp-Deletion im Kleinhirn bei chron. Hypoxie

In dieser Arbeit wurde, vergleichbar den Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen, im Kleinhirn nur eine geringe Menge der 4977bp-Deletion nachgewiesen.

Der zuvor erwähnte mögliche Zusammenhang zwischen vermehrter Akkumulation der 4977bp-Deletion im Kleinhirn und chronischer Hypoxie wurde auch in der Literatur gleichsinnig beschrieben. Andere Arbeitsgruppen berichten, dass im *Cerebellum* nach einem ischämischen Insult mehr freie Radikale produziert werden und somit vermehrt oxidative Schäden resultieren (Cardozo-Pelaez et al., 1999).

Die Untersuchungen von Merril et al. (1996) stützen die Beobachtungen, das Ischämie und Reperfusionsschäden nicht nur den Anstieg der 4977bp-Deletion im *Putamen* und *Cortex* bedingen, sondern auch im Kleinhirn zu einem vermehrten Anfall der *„common deletion“* führen. Dies gilt allerdings nur bei einer längeren Überlebenszeit nach dem ischämischen Ereignis.

Versucht man die eigenen Erkenntnisse mit denen von Zullo et al. (1999) in Einklang zu bringen, wäre denkbar, dass es zum Zeitpunkt einer akuten ischämischen Störung zu einer ausgeprägten oxidativen Schädigung der mitochondrialen DNA mit Vermehrung von 8-OH-dG kam.

Demgegenüber können bei einer längeren Hypoxiezeit die Mitochondrien mit der 4977bp-Deletion akkumulieren. Der Anteil der deletierten mitochondrialen DNA, vor allem im *Cerebellum*, könnte daher als Indikator für länger zurückliegende oder rezidiverende oxidative Schäden dienen.

Entsprechend der de Grey Hypothese „survival of the slowest“ (1997; 2000) kommt es zu einer Selektion der akut ischämisch geschädigten mitochondrialen Genome mit konsekutiv schneller Zunahme 4977bp-deletierter mtDNA. Diese werden der Hypothese nach aufgrund der geringeren Länge schneller reproduziert.

4.4.3 Pathophysiologische Veränderungen in anderen Geweben

Die Abnahme der oxidativen Phosphorylierung ist mit einer Akkumulation von mtDNA-Mutationen assoziiert. In der Folge führt dies zur Funktionseinschränkung des gesamten betroffenen Gewebes (Lee et al., 1994 et 1999).

In unserem Institut konnte bei ischämischen Herzkrankheiten eine erhöhte Akkumulation der 4977bp-Deletion nachgewiesen werden. Diese findet sich vor allem im linken Ventrikel, was z.B. durch den höheren Energiebedarf des mechanisch stärker belasteten linken Ventrikels und der dadurch entstehenden erhöhten Produktion von ROS im Zusammenhang stehen kann. Es fanden sich bis zu 220-mal mehr deletierte mtDNA-Moleküle im Gewebe von ischämisch geschädigten Herzen als in der Kontrollgruppe (Corral-Debrinski, 1992). Die akkumulierten DNA-Schäden korrelierten mit den Arealen der stärksten oxidativen Schädigung (Wallace, 1999).

4.4.4 Apoptose

Allgemein ist Hypoxie mit anschließender Reperfusion ein Stressfaktor für die Zelle, durch den eine Reihe von Stoffwechselprozessen gestört oder unterbrochen und Zellstrukturen zerstört werden. Wird eine bestimmte Schwelle überschritten, führt dies zum Zelltod. Die Erklärung für diesen Mechanismus liegt darin, dass bei einer Ischämie eine reversible Hemmung der Mitochondrienfunktion erfolgen kann (Browne et al., 1999). Nach einer Ischämie löst die anschließende Reperfusion eine Steigerung der Sauerstoffkonzentration aus. Dadurch kommt es zur vermehrten Bildung von Sauerstoff-Radikalen (ROS), welche entweder direkt die DNA schädigen oder indirekt durch Öffnung der in der mitochondrialen Innenmembran gelegenen Permeability-Transition-Pore (PTP) die Apoptose einleiten (Ozawa, 1999; Kujoth et al., 2005).

Die enge Verbindung zwischen Ischämie und dem Phänomen der Apoptose knn durch mehrere Arbeiten belegt werden, da es sowohl nach fokaler als auch nach globaler Ischämie kommt es zu einer Freisetzung von Cytochrom C und anderen proapoptotischen Faktoren in den Mitochondrien kommt (Keller et al., 1998; Van Remmen & Richardson, 2001).

Die Apoptose oder der „programmierte“ Zelltod bezeichnet die Eliminierung von Zellen nach einem genau festgelegten Programm (Schrumpfung des Zellkerns, Zerfall der Plasmamembran und Zelllyse). Der Vorgang der Apoptose ist energieabhängig und durch gesteigerte RNA- und Proteinbiosynthese gekennzeichnet. Dies steht ganz im

Gegensatz zur Nekrose, die durch physikalische oder chemische Verletzung bedingt auftritt und eine immunologische (Abbau-) Reaktion hervorruft.

Bei der Apoptose kommt es zur Ausschöpfung der Stammzellreserven, die für die Erneuerung eines Gewebes erforderlich sind. Bei den sogenannten *Mutator*-Mäusen (vgl. 4.3.2) ist dies ohne vermehrte ROS-Produktion an der verfrühten Alterung des Phänotyps zu erkennen. Zu den Symptomen gehören: Gewichtsverlust, Knochenmasseverlust, Muskelschwund, Herzvergrößerung, Altersschwerhörigkeit, Haarergrauung und - bei der Maus schwerer zu messen - die Demenz (Kujoth et al., 2007).

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wiesen in dieser Arbeit Proben von Personen höheren Lebensalters im Vergleich zur Wildtyp-mtDNA eine Sättigung der deletierten mitochondrialer DNA auf. Es wurden niedrigere Werte erreicht, als theoretisch in Zellen „dieses Alters“ vorliegen müßte, wenn man von einer expandierenden Akkumulation mtDNA ausgeht. Diese Sättigungskinetik im Verhältnis von deletierter zu nicht veränderter DNA könnte auch dadurch erklärt werden, dass ab einem bestimmten Maß an oxidativer Schädigung (8-OH-dG-Gehalt), also dem Überschreiten des Schwellenwertes von deletierter und damit nicht mehr korrekt kodierender mtDNA, die Apoptose initiiert wird und so Zellen mit einem höheren Deletionsanteil eliminiert werden. Eine direkte Verbindung zwischen Deletion und Apoptose konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.

Das im Allgemeinen bei älteren Personen und Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen ein Zellverlust stattfinden muss, kann schon makroskopisch durch die zunehmende Hirnatrophie, deren genaue Genese noch ungeklärt ist und die auch bei lebenden älteren Patienten in CCT-Befunden nahezu immer gesehen wird, belegt werden. Die oben beschriebene Sättigungskinetik konnte dagegen bei den untersuchten Proben des Kleinhirns nicht nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der veränderten DNA lagen hier deutlich niedriger als der gezeigte maximale Schwellenwert der anderen Hirnabschnitte. Gleiches gilt für das „Referenzgewebe“ Skelettmuskel.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die mtDNA in Geweben, die eine Hypoxie und/oder Ischämie mit anschließender Reperfusion durchlaufen, eine weit stärkere Akkumulation der 4977bp-Deletion aufweist als „altersgemäß“ zu erwarten wäre. Außerdem sind die Mitochondrien älterer Individuen, aufgrund der altersabhängigen Aktivitätsminderung der Atmungskettenkomplexe, verstärkt vulnerabel gegenüber Störungen durch die Folgen der Ischämie.

Zur weiteren Klärung der einzelnen Abläufe wäre es sinnvoll, *in vitro* Untersuchungen durchzuführen, die genauer auf den Zusammenhang von akkumulierten mtDNA-Deletionen oder klonal vermehrten zufälligen Punktmutationen und den auch funktionell veränderten Zellen eingehen.

4.5 Der Zusammenhang der 4977bp-Deletion mit Neurodegeneration

4.5.1 Mitochondriale Encephalomyopathien

Vergleichbar mit den pathophysiologischen Veränderungen im Zellstoffwechsel durch Hypoxie sind diejenigen, die bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten (Manfredi & Beal, 2000; Schon, 2003).

In den letzten 10 Jahren der Forschung wurden Hinweise gefunden, dass mitochondriale Fehlfunktionen bei vielen Erkrankungen aus allen Bereichen der Medizin beteiligt sind. Klinisch unterscheiden sich die Erkrankungen erheblich. Es zeigen sich jedoch Parallelen auf der biochemischen und molekularbiologischen Ebene. Ähnlichkeiten liegen auch in dem Vererbungsmuster vor. Es sind durch diverse Arbeitsgruppen bereits Einzelheiten in den durch die dafür kodierende veränderte DNA modifizierten Stoffwechselabläufen in hochdifferenzierten und sehr energieabhängigen Geweben (Hirn und Muskel) genauer analysiert worden. Mitochondriale Encephalomyopathien treten oft schon im Kindesalter auf und sind schwer klinisch zu diagnostizieren (Suomalainen, 1997; Kato et al., 2000).

Andere Arbeitsgruppen gingen hingegen speziell auf die Rolle der ROS bei der Entstehung und Weitervererbung mitochondrialer Encephalomyopathien ein (Kirkinezos & Moraes, 2001). Die Enzephalomyopathie MERRF und auch MELAS werden maternal als Punktmutationen in der Keimbahn vererbt (Matsumoto et al., 2005). Das Kearns-Sayre Syndrom (KSS) drückt sich durch einen Cytochrom-C-Oxidase Mangel aus, der durch eine chronische Ophthalmoplegia externa (CPEO) mit Ptosis und Doppelbildern klinisch symptomatisch wird. Es entsteht durch spontane somatische mitochondriale Deletionen (Wallace, 2001; Bau & Zierz, 2005).

Am Fallbeispiel eines am KSS mit CPEO erkrankten Jugendlichen zeigten Marin-Garcia et al. anhand von Muskelbiopsien die Funktionseinschränkung aller Atmungskettenkomplexe und die Strukturveränderungen, hier paracrystalline Einschlüsse, der betroffenen Mitochondrien. Ebenso wurde eine große Menge deletierter mtDNA nachgewiesen, was als Ausgangspunkt der Pathogenese gewertet wurde (Marin-Garcia et al., 2000). Auf das KSS bezieht sich auch die Studie von Ishikawa et al.. Sie

beobachteten über 10 Jahre die Progression eines Krankheitsverlaufes eines Individuums und stellten fest, dass die Menge an deletierter mtDNA nicht gleichsinnig mit dem Fortschreiten der klinischen Symptome anstieg, sie fiel aber auch nicht ab. Die mitochondriale Deletion könnte also in der Krankheitentstehung eine Rolle spielen, ohne einen Einfluss auf die Progression zu haben (Ishikawa et al., 2000).

4.5.2 Neurodegenerative Erkrankungen allgemein

Auch die klassischen neurodegenerativen Erkrankungen stehen im Zusammenhang mit strukturellen und funktionellen Veränderungen der mtDNA auf zellularer Ebene:

- Chorea Huntington :

Browne et al. (1997) konnten zeigen, dass die Funktion der Atmungskettenenzyme II, III und IV in *Striatum* von Patienten mit Chorea Huntington beeinträchtigt ist. Im *Cortex parietalis* konnte eine erhöhte oxidative Schädigung der mtDNA in einigen Cortexabschnitten festgestellt werden (Polidori et al., 1999). Es konnte sogar eine elfmal höhere Menge der 4977bp-Deletion nachgewiesen werden. Keine Schäden fanden sich jedoch im Kleinhirn und ebenfalls nur wenig im *okzipitalen Cortex* und *Putamen* (Horton et al., 1995). Dem widersprechen jedoch Aussagen von Chen et al. (1995), die bei Patienten im frühen Erkrankungsstadium sogar niedrigere Deletionsmengen als in der Kontrollgruppe ermittelten. Jedoch könnte ein erniedrigter Deletionsanteil in den entsprechenden Hirnabschnitten durch den Nervenzellverlust und die Gliose erklärt werden.

- Amyotrophe Lateralsklerose :

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose konnten Rosen et al. (1993) eine veränderte Gensequenz der Cu-/Zn-SOD zeigen. Funktionelle Störungen eines anderen Schutzenzyms, der Mn-SOD stehen im Zusammenhang mit Neurodegeneration, dilatativer Cardiomyopathie, metabolischer Azidose und einer generellen Funktionseinschränkung der Atmungskette (Melov et al., 1999; Dhaliwal et al., 2000).

- Morbus Parkinson :

Es konnte ein Mangel des Komplex I der Atmungskette (Schapira, 2006), eine Zunahme der 4977bp-Deletion (Ozawa, 1999) und eine erhöhte Menge an mtDNA Deletionen verschiedener Mengen und Längen in der *Substantia nigra* von an M. Parkinson Erkrankten im Vergleich zur altersgleichen Kontrollgruppe beobachtet werden (Gu et al., 2002; Bender et al., 2006).

- Morbus Alzheimer :

Im *Cortex* von Alzheimer- Patienten unter 75 Jahren wurde ein 6,5 – 15facher Anstieg der 4977bp-Deletion gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen (Hamblet & Castora, 1996). Patienten, die älter als 75 Jahre alt wurden, zeigten allerdings eine Abnahme der spezifischen Deletion, während sie in der Kontrollgruppe weiter anstieg.

Bei Patienten mit Morbus Alzheimer konnte neben oxidativer Schädigung der mitochondrialen Membranen durch Lipidoxidation (Mecocci et al., 1994) auch eine oxidative Schädigung (8-OH-dG) der mitochondriale DNA im Frontal- und Parietalhirn gezeigt werden (Lezza et al., 1999). Diese erhöhten Konzentrationen an 8-OH-dG im Zusammenhang mit oxidativen Schäden und mitochondrialer Dysfunktion konnten sowohl bei Alzheimer-Patienten als auch bei Patienten mit M. Parkinson (s.o.) dokumentiert werden (Liu, 2005; Schapira, 2006).

Andere Autoren widersprechen dem Zusammenhang zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und den Mutationen im mitochondrialen Genom. Die Defekte der Atmungskette seien nicht pathogenetisch bei diesen Erkrankungen, sondern nur ein unspezifisches Begleitphänomen (Cavelier et al., 1995).

4.5.3 Intrazelluläre Schutzmechanismen und Therapieoptionen

In den Zellen wirken Schutzsysteme, die einerseits exogen und endogen produzierte Radikale abfangen oder andererseits die entstandenen Schäden an der mitochondrialen DNA reparieren. Die Aktivität beider Systeme wird als altersabhängig beschrieben (Lu et al., 1999; Wei & Lee, 2002).

Zu den intrazellulär wirkenden Antioxidantien gehören die folgenden Enzyme: die Katalase, die Mn-SOD (Superoxiddismutase), die Cu-/Zn-SOD und die Glutathion-Peroxidase (Wiesner et al., 2006). Eine Überexpression der Mn-SOD reduziert oxidative Schäden des Nervengewebes und erhöht die Toleranz gegenüber cerebraler Ischämie (Keller et al., 1998). Wei et al. erklärten den exzessiven Anstieg von ROS im Alter ebenfalls durch die Imbalance zwischen der abnehmenden Aktivität der Cu-/Zn-SOD und der vermehrten Aktivität der Mn-SOD (Wei et al., 2001).

In einem Tierexperiment mit Knock-out-Mäusen, denen die mitochondrialen Superoxiddismutasen fehlten, wurde deren Einfluss veranschaulicht. Hier war die mtDNA einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt. Es konnten im Vergeich zu altersgleichen Kontrolltieren mehr mitochondriale Mutationen nachgewiesen werden, typische Alterserscheinungen traten verfrüht auf und die Lebensspanne war verkürzt (Melov et al., 1999).

Andere Arbeitsgruppen untersuchten die Substanzen, die z.B. über die Nahrung aufgenommen werden, auf das Altern auf zellulärer Ebene haben und suchten so nach potentiellen Therapieoptionen (u.a. Liu et l., 2005). Die protektive Wirkung des Extraktes des Gingko Biloba Baumes (EGb 761) wird in Bezug auf die Rolle bei oxidativem Stress in Alterungsvorgängen und Apoptose erforscht. Auch die Anwesenheit von Vitaminen (C und E), den „ natürlichen“ Radikalfängern, beugt oxidativen Schäden und der Glutathionoxidation und somit den altersbedingten neuronalen und mitochondrialen Funktionsverlusten vor (Melov et al., 1999; Sastre et al., 2003). Ebenso konnte der protektive und präventive Effekt von Vitaminen und Spurenelementen (B12, B6, Ascorbinsäure (Vitamin C), α-Tocopherol (Vitamin E), Folsäure, Niacin, Eisen und Zink) anhand großer amerikanischer Populationsstudien bezüglich DNA-Schädigungen, durchschnittlicher Lebenserwartung und erhöhtem Carcinomrisiko belegt werden (Ames, 1999 und 2003).

4.6 Die Erfassung der Akkumulation der 4977bp-Deletion und ihre Bedeutung in der Rechtsmedizin

Die Rechtsmedizin hat u.a. die Aufgabe, Todesursachen und –umstände auch noch nach Jahren zu klären und unbekannte Individuen zu identifizieren. Hierfür ist eine möglichst exakte Bestimmung des Lebensalters von großer Bedeutung. Seit Jahren ist es in der rechtsmedizinischen Praxis üblich, dieses z.B. an Knochenmaterial durchzuführen. Zur Individualtypisierung wurde die mtDNA aus Knochenproben untersucht, die zum Teil mehrere Jahre Liegezeit aufwiesen (Holland et al., 1993; Gill et al., 1994), oder aus Materialien, die starken Umwelteinflüssen ausgesetzt waren (Pääbo, 1989; Fisher et al., 1993; Lutz et al., 1996).

Durch die höhere Kopienzahl der mtDNA kann aus geringeren Mengen des Untersuchungsmaterials im Vergleich zur nukleären DNA eine ausreichende Menge für eine molekularbiologische Analyse gewonnen werden. Die längere Lagerbarkeit der mitochondrialen DNA, sowohl postmortal als auch in der aus dem Gewebe extrahierten Form, ist ein wichtiger Aspekt für eine Individualtypisierung.

Die mitochondriale DNA weist im Vergleich zur nukleären DNA eine höhere Mutationsrate auf, was zu einer hohen Polymorphie im D-Loop Bereich führt. Dieser kann in der Rechtsmedizin zur Individualtypisierung gerade bei degradierter nukleärer DNA angewendet werden (Wilson et al., 1995; Oota et al., 1995; Graeber et al., 1998). Neuere Untersuchungen aus unserem Institut konnten sogar ein altersabhängigen

gewebespezifischen „Fingerabdruck“, ein spezifisches Verteilunggmuster an mtDNA-Deletionen zeigen (Meissner et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Akkumulation dieser Deletionen in verschiedenen Abschnitten des menschlichen Gehirnes unter den physiologischen Bedingungen des Alterns erfasst, um eine mögliche Anwendung in der Rechtsmedizin, wie Individualtypisierung und anderen klinischen und diagnostischen Zwecken, zu prüfen.

Durch die Analyse der Akkumulation der 4977bp-Deletion der mtDNA in den verschiedenen Geweben wird eine Aussage über das Lebensalter der Probanden ermöglicht. Dies kann, wie in dieser Arbeit erläutert wurde, aber nur eine orientierende Einordnung (+/- 20 J.) sein, etwa die Differenzierung zwischen jungen und alten Individuen. Dies konnten auch andere Arbeitsgruppen bestätigen (vgl. VonWurmb-Schwark et al., 2002).

Einen „Normwert“ für das jeweilige Alter des Hirngewebes zu bestimmen ist mit dieser Methode nicht möglich, auch weil Ausschlusskriterien wie exogene Störfaktoren, Hypoxie, Neurodegeneration etc. nicht genau zu definieren sind.

Das in der forensischen Medizin gebräuchlichere und auch überlegenere Verfahren ist sicherlich die Altersbestimmung anhand von Knochen oder Zähnen durch Razemisierung der Asparaginsäure. Hier liegt die Genauigkeit bei +/- 6 Jahren (Ritz-Timme et al., 2000). Für Weichgewebeproben, wie das hier untersuchte Hirngewebe ist das Verfahren jedoch nicht anwendbar.

Außerdem bietet sich die in dieser Arbeit verwendete Methode der automatischen Quantifizierung der PCR-Amplifikate aufgrund des relativ geringen Zeit- und Arbeitsaufwandes bei guter Reproduzierbarkeit als praktikable Vorgehensweise für die benötigten Untersuchungen genetischen Materials in der forensischen Medizin an.

4.7 Ausblick

Die mitochondriale DNA liegt in den verschiedenen Zellen häufig in mehreren verschiedenen Kopien vor. Durch die hohe Kopienzahl mitochondrialer DNA in einer Zelle entsteht beim Auftreten einer Mutation eine Mischung von mutierter und Wildtyp-DNA, ein Zustand der Heteroplasmie. Deshalb muss die 4977bp-Deletion als ein stochastisches Phänomen betrachtet werden.

Altersbedingte Veränderungen der mtDNA sind als dynamisch anzusehen. Es besteht ein Beziehungsgeflecht zwischen endogenen Mutationen durch ROS, der DNA-Reparatur, dem Turnover der mitochondrialen DNA und der nukleären Kontrolle der

Kopienzahl (Kopsidas et al., 2000). Das wiederum kann zum Verlust der intakten Gesamt-mtDNA mit konsekutivem Energieverlust der Zelle führen, was auch Einfluss auf das Teilungs- und Wachstumsverhalten hat. Dieser Aspekt wird z.B. in der Erforschung der Tumorgenese untersucht.

Die Untersuchungen der 4977bp-Deletion der mtDNA in verschieden Abschnitten des menschlichen Gehirnes und Geweben allgemein bieten also lediglich eine Ergänzung für die makroskopischen und die histologischen Befunderhebungen in forensischen Fällen. Sie können nicht allein für klinische Fragestellungen wie z.B. die Altersbestimmung herangezogen werden. Zukünftig könnte die Regenerationsfähigkeit von Zellen mit der 4977bp-Deletion, mit Hilfe von *in vitro* Untersuchungen einer bestimmten Zelllinie, unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen in einer Einzelzelluntersuchung nachweisbar sein. Ebenso könnte eine weitere Klärung des Phänomens der Akkumulation von Mutationen im Zusammenhang mit dem sehr komplexen biologischen Alterungsprozess erfolgen. Hierbei stehen wie bei allen experimentellen Untersuchungen die sensible Messbarkeit der nachzuweisenden Phänome und ihre physiologische Relevanz in der Diskussion. Sind kaum oder nicht messbare Defekte der mtDNA ein Risiko für eine intakte Gewebefunktion (Jacobs, 2003)?

Anhand von *in vivo* Untersuchungen sollte weiter nach Lösungsansätzen gesucht werden, wie oxidativer Stress und Hypoxie bei der Entstehung von mtDNA- Deletionen mitwirken. Auch müssen der Einfluss von nukleären Mutationen auf die Funktionen der Atmungskette geklärt und Modelle zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation erstellt werden (vgl. auch Oldfors & Tulinius, 2003). Für Untersuchungen dieser Art wäre ein Tiermodell denkbar, an dem alle Abläufe und kausalen Verknüpfungen, die in der Theorie des Alterns diskutiert werden, wie z.B. Apoptose, Telomer-Veränderungen und mtDNA-Mutationen, wie z.B. Deletionen o.a. gleichzeitig beobacht werden könnten. Auch hier muß man natürlich hunterfragen ob die Ergebnisse, die bei Säugetieren, wie Ratten oder (*Mutator*-)Mäuse immer zu 100% auf den Menschen übertragbar sind, da in der Maus schon eine geringere Mutationsbeastung zu relevanten Veränderungen führt (Khrapko et al., 2006).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Akkumulation der 4977bp-Deletion, der sogenannten *„common deletion“*, der humanen mitochondrialen DNA (mtDNA) in verschiedenen postmortal gewonnenem Gewebe untersucht.

Für die Durchführung der Untersuchungen wurde in dieser Arbeit Gewebe aus fünf verschiedenen Arealen des Gehirnes (*Substantia nigra, Putamen, Nucleus caudatus, Cortex cerebri und Cortex cerebelli*) akut Verstorbener (50 Fälle), sowie der Skelettmuskulatur als Referenzgewebe ausgewählt und dabei das Ausmaß der Altersabhängigkeit dargestellt.

Für den Nachweis und die Quantifizierung der mtDNA-Fragmente dienten Acrylamid-Gele und der ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten *Primern*. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses lasergestützten Analyseverfahrens und der guten Reproduzierbarkeit und Amplifikationsausbeute der PCR, bei vergleichsweise geringem Zeit- und Arbeitsaufwand, ist diese Art des Nachweises für Fragestellungen in der forensischen Medizin oder der Neuropathologie sehr gut geeignet.

Es konnte eine Zunahme der 4977bp-Deletion der mtDNA mit steigendem Lebensalter nachgewiesen werden. Beim intraindividuellen Vergleich der Proben wurde im Kleinhirn eine ca. 100fach geringere Häufigkeit der *„common deletion“* als in den zentralen Kerngebieten beobachtet. Die 4977bp-Deletion war vor dem 10. Lebensjahr nicht nachweisbar, der Anteil an deletierter DNA relativ zur unveränderten mtDNA lag maximal bei 2,8 % in den zentralen Kerngebieten. In diesen scheint eine Sättigungskinetik im höheren Lebensalter vorzuliegen, die eventuell durch Apoptosevorgänge erklärt werden könnte.

Für die fünf verschiedenen Hirnabschnitte ergaben sich nach jeweils bis zu sechs unabhängigen Messungen folgende nicht parametrischen Korrelationskoeffizienten **r** zwischen Lebensalter und Menge der Deletion. In der *Substantia nigra* betrug r = 0,833; im *Putamen* r = 0,784; im *Nucleus caudatus* r = 0,790; im *Cortex cerebri* r = 0,813 und im *Cortex cerebelli* r = 0,672.

Es war aufgrund der beschriebenen Streuung nicht möglich eine eindeutige Zuordnung eines einzeln erhobenen Messwertes in eine Altersgruppe vorzunehmen, so dass die Bestimmung des Lebensalters eines Individuums allein auf Grundlage eines aufgefundenen „Stückes Hirngewebe“ nur näherungsweise (breites Konfidenzintervall) möglich ist.

6. ANHANG

6.1 Tabellen: Prozentuale Verhältnisse Deletion/Wildtyp

Alters-gruppe	Hirn-abschnitt	Alter	Median del/wt		Median del/wt		Median del/wt		Median del/wt		Median del/wt
1	**I**	**2 M**	0,00000	**3 M**	0,00000	**6 M**	0,00000				
	II		0,00000		0,00000		0,00000				
	III		0,00000		0,00000		0,00000				
	IV		0,00000		0,00000		0,00000				
	V		0,00000		0,00000		0,00000				
	VI		0,00000		0,00000						
2	**I**	**7**	0,00000	**8**	0,00000	**10**	0,00316				
	II		0,00000		0,00000		0,00000				
	III		0,00000		0,00000		0,00000				
	IV		0,00000		0,00000		0,00000				
	V		0,00000		0,00000		0,00000				
	VI				0,00000						
3	**I**	**12**	0,00334	**15**	0,00000	**16**	0,00000	**17**	0,00377	**20**	0,00096
	II		0,00123		0,00000		0,00331		0,00612		0,00281
	III		0,00082		0,00000		0,00938		0,00292		0,00582
	IV		0,00155		0,00000		0,00000		0,00375		0,00406
	V		0,00000		0,00000		0,00000		0,00000		0,00000
	VI		0,00000								0,00301
4	**I**	**21**	0,00327	**24**	0,01557	**28**	0,01731	**29**	0,02807	**30**	0,11920
	II		0,03179		0,04187		0,01784		0,10293		0,00727
	III		0,01497		0,02814		0,05560		0,02650		0,00803
	IV		0,00573		0,00425		0,01393		0,03512		0,01153
	V		0,00056		0,00009		0,00155		0,00000		0,00000
	VI				0,00027		0,00639		0,00044		0,00000
5	**I**	**31**	0,01931	**31**	0,06590	**35**	0,00969	**35**	0,10261	**38**	0,05833
	II		0,02190		0,03201		0,07336		0,02859		0,03556
	III		0,02069		0,05294		0,08620		0,09278		0,15139
	IV		0,00805		0,04718		0,01523		0,04588		0,01934
	V		0,00082		0,01015		0,00126		0,00043		0,00038
	VI		0,00818								0,00823
6	**I**	**41**	0,05790	**43**	0,08787	**44**	0,22048	**44**	0,04436	**45**	0,18343
	II		0,66400		0,20885		0,32713		0,08328		0,07612
	III		0,03662		0,57348		0,03853		0,04080		0,35704
	IV		0,01284		0,01898		0,03851		0,01276		0,14033
	V		0,00043		0,00060		0,00097		0,00133		0,00305
	VI		0,01233				0,00522		0,00056		0,00352
7	**I**	**51**	0,03788	**55**	2,23447	**55**	0,26211	**57**	0,34217	**57**	2,80975
	II		0,16684		0,15906		0,07467		0,17025		0,66349
	III		0,55876		0,76558		0,71718		0,73683		0,63927
	IV		0,01138		0,08272		0,04056		0,03998		0,01729
	V		0,00133		0,00319		0,00263		0,00246		0,00152
	VI		0,00405		0,01124		0,00462		0,00522		0,00503
8	**I**	**61**	0,65900	**62**	0,69877	**63**	2,93260	**68**	0,49375	**69**	1,04154
	II		1,43546		0,31988		0,52520		0,41551		0,65909
	III		1,54104		0,31596		0,60886		0,32594		1,25138
	IV		0,12212		0,10453		0,10034		0,18316		0,12064
	V		0,00114		0,00563		0,00343		0,00735		0,00880
	VI		0,00199								

9	**I**	**72**	1,22888	**73**	1,01947	**74**	0,62762	**76**	1,03917	**76**	0,94818
	II		0,28128		0,31959		0,23092		0,77372		0,54062
	III		0,99297		0,16215		0,10377		2,14265		0,99899
	IV		0,04324		0,14146		0,05250		0,15326		0,05790
	V		0,00107		0,00227		0,00235		0,00387		0,02379
	VI		0,01467		0,04935		0,03205		0,01518		0,30218
10	**I**	**83**	0,04885	**83**	0,50538	**84**	0,89096	**87**	1,50599	**87**	1,55016
	II		0,01100		0,17953		0,61358		0,15673		0,53381
	III		0,00636		0,33266		0,24221		0,55849		0,62518
	IV		0,00889		0,20600		0,06026		0,05050		0,16687
	V		0,00000		0,00049		0,00234		0,00145		0,00687
	VI		0,14255								0,10292
11	**I**	**91**	1,45059	**91**	0,95200	**93**	1,12614	**102**	1,19788		
	II		0,43071		0,48032		0,19640		0,15698		
	III		1,36403		0,68750		0,40864		0,45744		
	IV		0,03911		0,05857		0,07361		0,07448		
	V		0,00182		0,01158		0,00000		0,01298		
	VI		0,06754						0,14073		

Todesursachen der akut verstorbenen Personen aus den 11 Altersgruppen:

Altersgr.	Alter	Geschl.	Todesursache	Altersgr.	Alter	Geschl.	Todesursache
1	2 M	m	SIDS	6	45	w	v.a.Intoxikation
1	3 M	w	SIDS	7	51	m	Herzdurchschuss
1	6 M	m	SIDS	7	55	w	Hirnbasisaneurysma
2	7	w	Speisebreiaspiration	7	55	w	Kopfschuss
2	8	m	unklar	7	57	m	Aortenriss/Aneurysmaruptur
2	10	m	Reflextod	7	57	m	Ertrinken
3	12	m	Kopfschuss	8	61	w	Ertrinken
3	15	m	Thoraxtrauma/ Verbluten	8	62	w	Treppensturz
3	16	m	Ersticken	8	63	m	frischer HI
3	17	w	Ersticken/ Verbluten	8	68		CO/ GH
3	20	m	Verbluten	8	69	m	Verbluten
4	21	m	Herzstich	9	72	m	Luftembolie
4	24	m	Verbluten/Drosseln	9	73	m	Herzbeuteltamponade
4	28	m	Spontanpneumothorax	9	74	w	Ersticken/ Strangulation
4	29	w	HI	9	76	w	Parathion-Intoxikation
4	30	m	Ersticken	9	76		HBT
5	31	m	Lungenembolie	10	83	w	CO
5	31	m	Polytrauma	10	83	w	Ersticken
5	35	m	Ersticken	10	84	w	Ertrinken
5	35	w	Verbluten	10	87	m	Strangulation
5	38	m	Erhängen	10	87	w	Strangulation
6	41	m	Ertrinken	11	91	m	CO
6	43	m	Erhängen	11	91	w	Verbluten
6	44	m	Aortenaneurysma	11	93	m	CO- Intoxikation
6	44	m	Aortenaneurysma	11	102	w	Herzvers.,Verbrüh.schock

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
M	molar
mM	millimolar
bp	Basenpaar
kb	Kilobasen
U	Unit
s	Sekunde
min	Minute
h	Stunde
A	Ampere
W	Watt
V	Volt
°C	Temperatur in Celsius
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentralnervensystem
kD	Kilodalton
Aqua bidest	Doppelt destilliertes Wasser

Abkürzung	Bedeutung
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
MHC	Haupthistokompatibilitäts-komplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
dNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dUTP	Didesoxyribouracil triphosphat
UNG	Uracil N-Glycosylase
mtDNA	Mitochondriale DNA
dmtDNA	Delet. Mitochondriale DNA
wtmtDNA	Undelet. Mitochondriale DNA = Wildtyp
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Taq	Thermophilus aquaticus
AIF	Apoptose induz. Faktor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung Atmungskette
SOD	Superoxiddismutase
ELISA	Enzyme-liked immunosorbent assay
PAG	Polyacrylamidgel
PPR	Proteinpräzipitierende Reagenz
RT	Raumtemteratur

Verwendete Chemikalien

(Alle aufgeführten Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad p.A.)

Name	Hersteller
Aces2.0.Human DNA Detektion System	Gibco
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumnitrat	Fluka
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Acrylamid	National Diagnostics
Agarose	Dianova
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Serva
Chloroform	Merck
Dimethylsulfooxid (DMSO)	Janssen
Dithiotreitol (DTT)	BioRad
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Fixierer	Hypam
Foramide	Merck
Formaldehyd	Merck
Glycerin	Merck
Kaliumacetat	Roth
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Lithiumchlorid	Merck
Lumi-Phos Plus	Gibco BRL

Name	Hersteller
Natriumacetat	Roth
Natriumacetat-trihydrat	Roth
Natriumcarbonat	Merck
Natriumcarbonat-decahydrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Phenol	Roth
Röntogen Rapid Entwickler	Tetenal
Salpetersäure	Merck
Salzsäure	Roth
Schwefelsäure	Merck
Silbernitrat	Caelo
TEMED	BioRad
TMAC	Sigma
Tris	Merck
Xylol	Merck
2-Propanol	Merck

Verwendete Enzyme

Name	Hersteller
UNG(Uracil N-Glycosylase)	Applied Biosystems
Platinum *Taq Polymerase*	Applied Biosystems

Verwendete Geräte

DNA-Extraktion

Photometer

Slotblot

Acrylamidgele

PCR

Amplifikation

Name	Hersteller
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Waage	Scaltec
Thermostat (Heizblock)	Roth
Zentrifuge, Biofuge 17 RS	Heraeus Sepatech
Spektralphotometer	Lange
Fluorometer	BioRad
Slotblot- Apparatur	Gibco
Membran, ungeladen, Biodyne A Nylonmembran	Pall
Schüttler	Gerhardt
Röntgenfilme, Ortho G 100	Kodak
Röntgenkassette	DuPont
Wasserbad	Köttermann
ph- Meter	Amphenol
Spannungsgerät Power PAC 3000	BioRad
Magnetrührer	Ikamag
GelBond- PAG Trägerfolie	Biozym
Glasplatten 14 x 26 x 0,4 cm	Gibco
Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600)	Applied Biosystems
Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400)	Applied Biosystems
MicroAmp Deckel und Reaktionsgefäße	Perkin Elmer
MicroAmp Halterahmen 2400 und 9600	Perkin Elmer
MicroAmp Tray, Retainer 2400 und 9600	Perkin Elmer
ABI Prism™ 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Genetic Analyzer Sample Tubes	Perkin Elmer

Ansatz der benötigten Lösungen

Agaroseplugs: DNA-Agarose 3 % in 200 ml Elektrodenpuffer aufkochen, in Gelwanne füllen, 1h auspolymerisieren und in 1 cm breite und 24 cm lange Streifen teilen, in Elektrodenpuffer bei 8°C lagern

AP: (= Ammoniumpersulfat) 10 % in Bidest bei –20°C aufbewahren, aufgetaut bei 4°C 1 Woche haltbar

Bromphenolblau: BPB 0,5 %

Denaturierungslösung für Slotblot**:** 0,5M NaCl, 0,5M NaOH

Essigsäure: 10 %

Finalwaschpuffer: 1,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl, pH 8,6

Formamidpuffer: 10mM NaOH, 95% Formamid, 0,0005 % BPB, 0,0005 % Xylencyanol

Glycerol: 5 %

Leitern für Gele**:** 1:40 mit 1x TE-Puffer verdünnen, bei 4°C lagern, je 5µl auftragen (entspr. 31,25 ng/ lane)

Natriumacetat: 3M

Na_2CO_3: 0,28M, bei 70°C unter Rühren lösen, 0,0002 % Formaldehyd zugeben

Na_2HPO_4: 0,5M

Salpetersäure: 1 %

SSC(20x)**:** 3M NaCl, 0,3M Na-citrat

Tris- SSC für Slotblot**:** 0,2M Tris in 2x SSC, pH 7,5

Waschpuffer: 500 µl SDS (10 %) + 500 µl Na2HPO4 (0,5M) + 49 ml Bidest

Alle Pufferlösungen werden, wenn nicht anders angegeben, mit Aqua bidest angesetzt, sterilfiltriert und autoklaviert.

Literatur

Alberts B, Bray D, Rauff M, Roberts K, Watson JD (1995): Molekularbiologie der Zelle, 3.Auflage, Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Ames, BN (1999): Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage. Ann NY Acad Sci 889: 87-106

Ames BN (2003): The metabolic tune-up: metabolis harmony and disease prevention. J Nutr 133: 1544-1548

Applied Biosystems, ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Users Manual, (Mertes G, Schäfer T) Weiterstadt, Wiley-VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Arnheim N, Cortopassi G (1992): Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. Mutat Res 275: 157-167

Ballard JW, Dean MD (2001): The mitochondrial genome: mutation, selection and recombination. Curr Opin Genet Dev 11: 667-672

Ballinger SW, Bouder TG, Davis GS, Judice SA, Nicklas JA, Albertini RJ (1996): Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking. Canc Res 56: 5692-5697

Bank C, Soulimane T, Schröder M, Buse G, Zassen S (2000): Multiple deletions of mtDNA remove the light strand origin of replication. Biochem BiophysRes Commun 279: 595-601

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 196: 80-83

Bau V, Zierz S (2005): Update on chronic progressive external ophthalmoplegia. Strabismus 13: 133-142

Beal MF (2005): Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. Ann Neurol 58: 495-505

Benda C (1902): Mitochondria. Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte, 12: 743-781

Bender A, Krishnan J, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perrry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnball DM (2006): High leves of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. Nat Genet 38: 515-517

Berneburg M, Grether-Beck S, Kürten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J (1999): Singlet oxygen mediates the UVA- induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J Biol Chem 274: 15345-15349

Bianchi MS, Bianchi NO, Bailliet G (1995): Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients. Cytogenet Cell Genet 71: 99-103

Biesalski HK (2002): Free radical theory of aging. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5: 5-10

Bohr VA, Stevnser T, de Souza-Pinto NC (2002): Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. Gene 286: 127-134

Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF (1997): Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. Ann Neurol 41: 646-653

Bua EA, McKiernan SH, Wanagat J, McKenzie D, Aiken JM (2002): Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. J Appl Physiol 92: 2617-2624

Buttke TM, Sandstrom PA (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immun Tod 15: 7-10

Cardozo-Pelaez F, Song S, Parthasarathy A, Hazzi G, Naidu K, Sanchez-Ramos J (1999): Oxidative DNA damage in mouse brain. Mov Disord 14: 972-980

Cavelier L, Jazin EE, Eriksson I, Prince J, Bave U, Oreland L, Gyllensten U (1995): Decreased cytochrome C activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in brains of schizophrenics. Genomics 29: 217-224

Chabi B, de Camaret BM, Chevrollier A, Boisgard S, Stepien G (2005): Random mtDNA deletions and functional consequence in aged human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 332: 542-549

Chan DC (2006): Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging and development. Cell 125: 1241-1252

Chen X, Bonilla E, Sciacco M, Schon EA (1995): Paucity of deleted mitochondrial DNA in brain regions of Huntington's disease patients. Biochim Biophys Acta 1271: 229-233

Chevet E, Lemaitre G, Katinka MD (1995): Low concentration of tetramethylammonium cloride increase Yield and specifity of PCR. Nucl Acids Res 23: 3343-3344

Clayton DA (1992): Transcription and replication of animal mitochondrial DNA. Int Rev Cytol 141: 217-232

Corral-Debrinski M, Horton T, Shoffner JM, Lott MT, Beal MF, Wallace DC (1992): Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. Nat Genet 2: 324-329

Cortopassi GA, Wong A (1999): Mitochondria in organismal aging and degeneration. Biochim Biophys Acta 1410: 183-193

Cortopassi GA (2002): Fixation of deleterious alleles, evolution and human aging. Mech Ageing 123: 851-855

de Grey AD (1997): A proposed refinement of mitochondrial free radical theory of aging. Bioessays 19: 161-166

de Grey AD (2000): The reductive hotspot hypothesis: an update. Ar Biochem Biophys 373:295-301

Dhaliwal GK, Grewal RP (2000) Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. Neuroreport 11: 2507-2509

DiDonato S, Zeviani M, Giovannini P, Savarese N, Rimoldi M, Mariotti C, Girotti F, Caraceni T (1993): Respiratory chain and mitochondrial DNA in muscle and brain in Parkinson's disease patients. Neurol 43: 2262-2268

DiLisa F, Menabo R, Canton M, Petronilli V (1998): The role of mitochondria in the salvageand the injury of the ischemic myocardium. Biochim Biophys Acta 1366: 69-78

Elson JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF (2001): Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. Am J Hum Genet 68: 802-806

Englander EW, Greeley GH, Wang G, Perez-Polo JR, Lee HM (1999) Hypoxia-induced mitochondrial and nuclear DNA damage in rat brain. J Neurosci Res 58: 562-569

Finsterer J (2006): Overview of visceral manifestations of mitochondrial disorders. Neth J Med 64: 61-71

Fischel-Ghodsian N, Bohlman MC, Prezant TR, Graham JM, Cederbaum SD, Edwards MJ (1992): Detection in blood mitochondrial DNA in Kearns- Sayre syndrome. Pediatr Res 31: 557-560

Fisher DL, Holland MM, Sledzik PS, Wilcox AW, Wadhams M, Weedn VW (1993): Extraction, Evaluation and Amplification of DNA from decalcified and decalcified US civil war bone. J Forensic Sci 38: 60-68

Fukushima S, Honda K, Awane M, Yamamoto E, Takeda R, Kaneko I, Tanaka A, Morimoto T, Tanaka K, Yamaoka Y (1995): The frequency of 4977 bp base pair deletion of mitochondrial DNA in various types of liver disease and in normal liver. Hepatology 21: 1547-1551

Ghibelli L, Coppola S, Rotilio G, Lafavia E, Maresca V, Ciriolo MR (1995): Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH Extrusion. Biochem Biophys Res Commun: 313-320

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC (1980): Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 77: 6715-6719

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett L, Hagelberg E, Sullivan K (1994): Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nat Genet 6: 130-135

Graeber MB, Grasbon-Frodl E, Eitzen UV, Kösel S (1998): Neurodegeneration and aging: role of the second genome. J Neurosci Res 52: 1-6

Gu G, Reyes PE, Golden GT, Woltjer RL, Hulette C, Montine TJ, Zhe J (2002): Mitochondrial DNA deletions/rearrangements in parkinson disease and related neurodegenerative disorders. J Neuropathol Exp Neurol 61: 634-639

Haas H, Budowle B, Weiler G (1994): Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for the seperation of DNA fragments. Electrophoresis 15: 153-158

Halliwell B (2006): Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J Neurochem 97: 1634-1658

Hamblet N, Castora F (1996): Mitochondrial DNA deletion analysis: A comparison of PCR quantitative methods. Biochem Biophys Res Commun 207: 839-847

Harman D (1956): Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontl 11: 298-300

Harman D (1992): Free radical theory of aging. Mutat Res 275: 257-266

Harman D (2006): Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. Ann NY Acad Sci 1067: 10-21

Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodrigues WC, Canik JJ, Merril CR, Weedn VW (1993): Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the Vietnam war. J Forensic Sci 38: 542-553

Horton T, Graham BH, Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Kaufman AE, Beal MF, Wallace DC (1995): Marked increase in the mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients. Neurology 45: 1879-1883

Hsieh RH, Hou JH, Hsu HS, Wei YH (1994): Age- dependent respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria. Biochem Mol Biol Int. 32: 1009-1022

Iizuka T, Sakai F (2005): Pathogenesis of stroke-like episodes in MELAS: analysis of neurovascular cellular mechanism. Curr Neurovasc Res 2: 29-45

Ishikawa Y, Goto Y, Ishikawa Y, Minami R (2000): Progression in a case of Kearns-Sayre syndrome. J Child Neurol 15: 750-755

Jacobs HT (2003): The mitochondrial theory of aging: dead or alive? Aging Cell 2: 11-17

Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA (2006): Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. J Inherit Metab Dis 29:499-515

Kalman B, Lublin FD, Adler H (1996): Characterization of the mitochondrial DNA in patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci 140: 75-89

Kato T, Kato N (2000): Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. Bipolar Disord 2: 180-190

Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, StBlair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ (1998): Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. J Neurosci 18: 687-697

Khrapko K, Kraytsberg Y, de Grey AD, Vijg J, Schon EA (2006): Does premature aging of the mtDNA mutator mouse prove that mtDNA mutation are involved in natural aging? Aging Cell 5: 279-282

Khrapko K, Vijg J (2007): Mitochondrial DNA mutations and aging: a case closed? Nat Genet 39: 445-446

Kim SH, Chi JG (1997): Characterization of the mitochondrial DNA deletion in Patients with mitochondrial myopaty. Mol Cell 7: 726-729

Kirkinezos IG, Moraes CT (2001): Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. Semin Cell Dev Biol 12: 449-457

Kopsidas G, Kovalenko SA, Heffenan DR, Yarovaya N, Kramarova L, Stojanovski D, Borg J, Islam MM, Caragounis A, Linnane AW (2000): Tissue mitochondrial DNA changes: A stochastic system. Ann NY Acad Sci: 227-243

Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K (2006): Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. Nat Genet 38: 518-520

Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R,

Leeuwenburgh C, Prolla TA (2005): Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. Science 309: 481-484

Kujoth GC, Bradshaw PC, Haroon S, Prolla TA (2007): The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. PloS Genet 3: e24

Kwong LK, Sohal RS (2000): Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. Arch Biochem Biophys 373: 16-66

Lee CM, Weindruch R, Aiken JM (1997): Age-associated alterations of the mitochondrial genome. Free Radic Biol Med 22: 1259-1269

Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH (1994): Differential accumulation of 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA of various tissues in human aging. Biochim Biophys Acta 1226: 37-43

Lee HC, Lim MLR, Lu CY, Liu VWS, Fahn HJ, Zhang C, Wei YH (1999): Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging- smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. Arch Biochem Biophys 362: 309-316

Lenaz G, Baracca A, Fato R, Genova ML, Solaini G (2006): New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease. Antioxid Redox Signal 8: 417-437

Lezza AM, Mecocci P, Cormio A, Beal MF, Cherubini A, Cantatore P, Senin U, Gadaleta MN (1999): Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. FASEB J 13: 1083-1088

Liu J, Ames BN (2005): Reducing mitochondrial decay with mitochondrial nutrients to delay and treat cognitive dysfunction, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Nutr Neurosci 8: 67-89

Liu VWS, Zhang C, Nagley P (1998): Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during aging. Nucl Acids Res 26: 1268-1275

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Lawrence-Zipursky S, Matsudaira P, Darnell J (1996): Molekulare Zellbiologie 2. Aufl., de Gruyter Verlag, Berlin, Kap.17 u. 19

Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH (1999): Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavening enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. Mutat Res 423: 11-21

Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S (1996): MtDNA as a tool for identification of human remains. Int J Legal Med 106: 190-193

Manfredi G, Beal MF (2000): The role of mitochondria in pathogenesis of neurodegenerative diseases. Brain Pathol 10: 462-472

Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ (2000): Heart mitochondrial DNA and enzyme change during early human development. Mol and Cell Biochem 210: 47-52

Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Sarnat HB (2000): Kearns-Sayre syndrome with a novel mitochondrial DNA deletions. J Child Neurol 15: 555-558

Matsumoto J, Saver JL, Brennan KC, Ringman JM (2005): Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke (MELAS). Rev Neurol Dis 2: 30-34

Mecocci P, McGarvey U, Beal MF (1994): Oxidative damage is increased in Alzheimer's disease. Ann Neurol 36: 747-751

Mehmet H, Yue X, Penrice J, Cady E, Wyatt JC, Sarraf C, Squier M, Edwards AD (1998): Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia. Cell Death Differ 5: 321-329

Meissner C, vonWurmb N, Oehmichen M (1997): Detection of age-dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA. A pilot study. Int J Legal Med 110: 288-291

Meissner C, vonWurmb N, Schimansky B, Oehmichen M (1999): 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

Meissner C, Schwark T, vonWurmb N, Oehmichen M (2000): Cerebellar mitochondrial DNA deletion associated with survival of prolonged ischemia. In Oehmichen, M. (Editor) Brain hypoxia and ischemia. Schmidt-Römhild, Lübeck.: 179-192

Meissner C, Mohamed SA, vonWurmb N, Oehmichen M (2001): The mitochondrial genome and aging. Z Gerontol Geriatr 34: 447-451

Meissner C, Bruse P, Oehmichen M (2006): Tissue-specific deletion pattern of the mitochondrial genome with advancing age. Exp Gerontol 41: 518-524

Meissner C (2007): Mutations of mitochondrial DNA – cause or consequence of the ageing process? Z Gerontol Geriatr 40: 325-333

Meissner C, Bruse P, Mohamed AS, Schulz A, Warnk H, Storm T, Oehmichen M (2008): The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of brain: a useful biomarker or more? Exp Gerontol (Epub ahead of print), PMID: 18439778

Melov S, Schneider J, Coskun PE, Bennett DA, Wallace DC (1999): Mitochondrial DNA rearrangements in aging human brain and in situ PCR of mtDNA. Neurobiol Aging 20: 565-571

Melov S, Coskun PE, Wallace DC (1999): Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress and senescence. Mutat Res 434: 233-242

Merril CR, Zullo S, Ghanbari H, Herman MM, Kleinman JE, Bigelow LB, Bartko JJ, Sabourin DJ (1996): Possible relationship between conditions associated with chronic hypoxia and brain mitochondrial DNA deletions. Arch Biochem Biophys 326: 172-177

Mertes G, Schäfer T, Schild TA, Schuster D, vom Stein J (1997): Automatische genetische Analytik. Wiley- VCH, Weinheim

Miquel J (1998): An update to the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. Exp Gerontol 33: 113-126

Mitchell P (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen tranfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191: 144-148

Mitchell P (1979): Konzept der Atmungskette und dessen chemieosmotischen Konsequenzen (Nobel-Vortrag) Angew Chem 91: 718-733

Mito NET, http://www.mitomap.org, http://www.gen.emory.edu/mitomap.html

Mohamed SA, Wesch D, Blumenthal A, Bruse P, Windler K, Ernst M, Kabelitz D, Oehmichen M, Meissner C (2004): Detection of the 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells. Exp Gerontol 39: 181-188

Mohamed SA, Hanke T, Erasmi AW, Bechtel MJ, Scharfschwerdt M, Meissner C, Sievers HH, Gosslau A(2006): Mitochondrial DNA deletions and the aging heart. Exp Gerontol 41: 508-517

Moraes CT, Schon EA, DiMauro S, Miranda AF (1989): Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre Syndrome. Biochem Biophys Res Commun 160: 765-771

Müller-Höcker J (1994): Molecular pathology of mitochondrial disorders. Verh Dtsch Ges Pathol 78: 48-93

Nelson I, Degoul F, Obernaier-Kusser B, Romero N, Borrone C, Morsac C, Vayssiere JL, Gerbitz K, Ponsot G, Lestienne P (1989): Mapping of heteroplasmic mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre Syndrome. Nucleic Acids Res 17: 8117-8124

Newton CR, Graham A (1994): PCR, Labor im Fokus, 1.Aufl. 39, Spektrum Verlag, Heidelberg

O'Brien TW, Denslow ND, Anders JC, Courtney BC (1990): The translation system of mammalian mitochondria. Biochim Biophys Acta 1050: 174-178

Ohta S, Ohsawa I (2006): Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. J Alzheimers Dis 9: 155-166

Oldfors A, Tulinius M (2003): Mitochondrial encephalomyopathies. J NeuropatholExp Neurol 62: 217-227

Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S (1995): A genetic study of 2000 year old human remains from Japan using mitochondrial sequences. Am J Phys Anthropol 98: 133-145

Ozawa T (1999): Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. J Bioenerg and Biomembr Vol.21: 377-390

Pääbo S (1989): Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1939-1943

Passos J, Saretzki G, Ahmed A, Nelson G, Richter T, Peters H, Wapper I, Birket M, Harold G, Schaeuble K, Birch-Machin MA, Kirkwood TBL, von Zglinicki T (2007): Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. PloS Biology 5: e110

Patel MN (2002): Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and epilepsy. Free Radic Res 36:1139-1146

Pfanner N, Weinzierl A (1992): Mechanism of mitochondrial protein import. Int J Biochem 24: 65-69

Phadnis N, Sia RS, Sia EA (2005): Analysis of repeat-mediated deletions in the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. Genetics 171: 1549-1559

Piko L, Hougham AJ, Bulpitt KJ (1998): Studies of sequence heterogenety of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: evidence for an increased frequency of deletions/ additions with aging. Mech Ageing Dev 43: 279-293

Polidori MC, Mecocci P, Browne SE, Senin U, Beal MF (1999): Oxidative damage of mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. Neurosci Lett 272: 53-56

Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, Melton JV, Pang CY, Wei YH, Murphy MP (1998): Bioenergetic consequences of accumulating the commom 4977 bp mitochondrial DNA deletion. Eur J Biochem 257: 192-201

Prado F, Cortes-Ledesma F, Huertas P, Aguilera A (2003): Mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet 42: 185-198

Prithivirajsingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, Stevens CW, Buchholz TA, Brock WA (2004): Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. FEBS Lett 571: 227-232

Rasmussen UF, Krustrup P, Kjaer M, Rasmussen HN (2003): Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging. A study of isolated human skeletal muscle mitochondria. Exp Gerontol 38: 877-886

Richter C (1995): Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to aging. Int J Biochem Cell Biol 27: 647-653

Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch HJ, Borrmann HIM (2000): Age estimation: The state of the art in relation of the specific demands of forensic practise. Int J Legal Med 113: 129-136

Robin ED, Wong R (1988): Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. J Cell Physiol 136: 507-513

Rödel G (1994): Mutationen des mitochondrialen Genoms. Pathologe 15: 315-320

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Got J, O'Regan JP, Deng HX (1993): Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362: 59-62

Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, Yi C, Kreuziger J, Baldi P, Wallace DC (2007): An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. Nucl Acids Res 35: 823-828

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. 2.Ed., Cold Spring Harvor Laboratory Press

Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJ (1994): Rapid silver staining of PCR amplfied products seperated on polyacrylamid gels. Biotechniques 17: 209-214

Sastre J, Pallardo FV, Vina J (2003): The role of mitochondrial oxidative stress in aging. Free Radic Biol Med 35: 1-8

Schapira AH (2006): Mitochondrial disease. Lancet 368: 70-82

Schon EA, DiMauro S (2003): Medicinal and genetic approaches to the treatment of mitochondrial disease. Curr Med Chem 10: 2523-2533

Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC (1989): Spontaneous Kearns- Sayre/ chronic external ophtalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: A slip-replication model and metabolic therapy. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7952-7956

Shoffner JM (2001): An introduction: oxidative phosphorylation diseases. Semin Neurol 21:237-250

Simonetti S, Chen X, DiMauro S, Schon EA (1992): Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. Biochim Biophys Acta 1180: 113-122

Skulachev VP (2006): Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. Apoptosis 11: 473-485

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002): Mechanism of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radic Biol Med 33: 575-586

Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N (1992): Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. Nat Genet 2: 318-323

Soumalainen A (1997): Mitochondrial DNA and disease. Ann Med 29: 235-246

Srivastava S, Moraes CT (2005): Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. Hum Mol Genet 14: 893-902

Storm T, Rath S, Mohamed SA, Bruse P, Kowald A, Oehmichen M, Meissner C (2002): Mitotic brain cells are just as prone to mitochondrial deletions as neurons: a large-scale single-cell PCR study of the human caudate nucleus. Exp Gerontol 37: 1387-1398

St-Pierre J, Bickingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002): Topology of superoxide production from different sites in the electron transport chain. J Biol Chem 277: 44784-44790

Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A, Chinnery PF, Samuels DC, Taylor GA, Plusa SM, Needham SJ, Kirkwood TB, Greaves LC, Turnbull DM (2003): Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. J Clin Invest 112: 1351-1360

Thayer RE, Wittock R, Parr R, Zullo S, Birch-Machin MA (2003): A maternal line study investigating the bp mitochondrial DNA deletion. Exp Gerontol 38: 567-571

Trifunovic A, Hansson A, Wredenberg A, Rovio AT, Dufour E, Khvorostov I, Spelbrink JN, Wibom R, Jakobs HAT, Larsson NG (2005): Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. Proc Natl Acad Sci USA 102: 17993-17998

Van Remmen H, Richardson A (2001): Oxidative damage to mitochondria and aging. Exp Gerontol 36: 957-968

von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech AP, Meissner C, Oehmichen M, Cortopassi GA (2002): Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. Forensic Sci Int 126: 34-39

Wallace DC (1999): Mitochondrial diseases in man and mouse. Science 283: 1482-1488

Wallace DC (2001): Mitochondrial defects in neurodegenerative disease. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 7: 158-166

Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, Horton T, Jun AS, Lott MT (1995): Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. Biochim Biophys Acta 1271: 141-151

Walter PB, Knutson MD, Paler-Martinez A, Lee S, Xu Y, Viteri FE, Ames BN (2002): Iron deficiency and iron exess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. Proc Natl Acad Sci USA 99: 2264-2269

Wei YH, Pang CY, Lee HC, Lu CY (1998): Roles of mitochondrial DNA mutation and oxidative damage in human aging. Curr Sci 74: 887-893

Wei YH, Lee CF, Lee HC, Ma YS, Wang CW, Lu CY, Pang CY (2001): Increases of the mitochondrial mss and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA. Ann NY Acad Sci 928: 97-112

Wei YH, Lee HC (2002): Oxidative stress, mitochondrial DNA mutations and impairment of antioxidant enzymes in aging. Exp Biol Med 227: 671-682

Wiesner RJ, Zsurka G, Kunz WS (2006): Mitochondrial DANN damage and the aging process-facts and imaginations. Free Radic Res 40: 1284-1294

Wilson MR, DiZinno JA, Polanskey D, Repogle J, Budowle B (1995): Validation to mtDNA sequencing for forensic casework analysis. Int J Leg Med 108: 68-74

Woodman RC, Ruedi JM, Jesaitis AJ, Okamura N, Quinn MT, Smith RM, Curnutte JT, Babior BM (1991): Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils. J Clin Invest 87: 1345-1351

Yakes FM, van Houton B (1997): Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA 94: 514-519

Yamamoto H, Tanaka M, Katayama M, Obayashi T, Nimura Y, Ozawa T (1992): Significant existence of deleted mitochondrial DNA in cirrhotic liver surrounding hepatic tumor. Biochem Biophys Res Commun 182: 913-920

Yen TC, King KL, Lee HC.,Yeh SH, Wei YH (1994): Age-dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria. Free Rad Biol and Med 16: 207-214

Zhang C, Liu VW, Naqley P (1997): Gross pattern of mitochondrial DNA deletions in skeetal muscle tissues of an individual adult humn subject. Biochem Biophys Res Commun 233: 56-60

Zullo SJ, Cerritos A, Merril CR (1999): Possible relationship between conditions associated with chronic hypoxia and brain mtDNA deletions; reduction of genomic 8-hydroxyguanine levels in human brain tissues containing elevated levels of the human mtDNA 4977 bp deletion. Arch Biochem Biophys 367: 140-142

Zullo SJ (2001): Gene therapy of mitochondrial DNA mutations: a brief biase history of allotopic expression in mammalian cells. Semin Neurol 21: 327-335

Danksagung

Der experimentelle Anteil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck vom März 1999 bis Juli 2002 durchgeführt.

Zuerst möchte ich mich beim Direktor des Institutes für Rechtsmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck Herrn Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch und dem ehemaligen Direktor Herrn Professor Dr. med. M. Oehmichen bedanken, die es mir ermöglichten, die Promotionsarbeit im Institut durchzuführen, indem sie mir dn Arbeitsplatz und das Material überließen.

Ebenso danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. C. Meißner für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Unterstützung und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Er hat mich über fast 10 Jahre meines Lebens begleitet. Es ist seiner Geduld und seinem Vorbild als Mensch und Arzt zu verdanken, dass ich nicht aufgegeben habe.

Ein großer Dank gebührt auch Herrn Dr. rer. nat. S. Mohammed, der mit unendlicher Geduld mir während der praktisch experimentellen Durchführung der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Aber vor allem möchte ich Ehemann, meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danken, die stets für mich da waren, um mich moralisch zu unterstützen und mir den Rücken freizuhalten. Danke Hans - für deine einmalige Art zu motivieren. Meinen Kindern, die eine erheblich kürzere Produktionszeit hatten als diese Arbeit, danke ich für die Erkenntnis, dass man immer noch ein Projekt mehr gleichzeitig verfolgen kann und es noch viel, viel mehr im Leben gibt.

Zuletzt danke ich meinem Arbeitgeber und Dienstherren, dass er mich nicht nur viel von der Welt sehen ließ und mich mit unzählbaren nicht medizinischen Aufgaben herausforderte, sondern mir letztlich auch ermöglichte diese Arbeit zu beenden.

Lebenslauf

Schauenburger Weg 17, 23795 Bad Segeberg
0160/ 93721338, anschi.schulz@web.de

Anja Schulz (geb. Gehlsen - Lorenzen)

geboren am 27. März 1975 in Rendsburg, Schleswig – Holstein
verheiratet seit dem 18. Juli 2002, Geburt des ersten Sohnes (Felix) am 29.01.05
Geburt des zweiten Sohnes (Lukas) am 05.05.06

Ausbildung:

- Juli 1981 – Juni 1985 Grundschule Fockbek
- Juli 1985 – Juni 1994 Gymnasium Herderschule Rendsburg
- Juli 1994 Eintritt in die Sanitätsoffiziers-Laufbahn der Bundeswehr (SaZ 16)
    - Milit. Grundausbildung und Seekadettenlehrgang an der Marineoffizierschule (Flensburg Mürwik)
    - Seemännische Ausbildung auf dem SSS „Gorch Fock“ und dem SMS „Herten“
    - SanOffz- Lehrgang an der Sanitätsakademie der BW in München
    - Sanitätsdienstl. Weiterbildung an der MVS List und BWKrhs Kiel
- Oktober 1995 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der MUzL
  1997 Physikum
- Oktober 1997 Klinisches Studium an der Medizinischen Universität zu Lübeck
  1998 1. Staatsexamen
  2000 2. Staatsexamen
  2001 3. Staatsexamen
- November 2001 – Februar 2004 Weiterbildungsassistent im BWKrhs Hamburg für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin
- November 2003 Erwerb der Bereichsbezeichnung Rettungsmedizin der ÄK HH
- Auslandseinsatz KFOR 8. Kontingent Feldlazarett Prizren/ Kosovo 2003/04
- Seit Februar 2004 Truppenarzt beim Marinefliegergeschwader 3 Nordholz
- Betreuung OEF Djibouti, UNIFIL Libanon
- Juli 2004 Fliegerarztlehrgang (Flugmedizinisches Institut der BW Fürstenfeldbruck) danach 2. Fliegerarzt und Taucherarzt des MFG 3 „Graf Zeppelin“ in Nordholz
- Seit Mai 2007 Fortsetzung der Fachweiterbildung Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie im BWKrhs Hamburg