

**Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. D. Patzelt**

**Quantifizierung des postmortalen RNA-Status im Gehirn mittels  
Realtime-PCR:  
Ein Beitrag zur Bestimmung der Leichenliegezeit**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Christina Walter  
aus Weldingsfelden  
Würzburg, Januar 2008**

**Referent: Prof. Dr. med. Dieter Patzelt**  
**Koreferent: Prof. Dr. med. Tiemo Grimm**  
**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung:**  
**30.07.2008**

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Einführung in die Thematik .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Bedeutung der Leichenliegezeit .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Leichenschau.....	2
1.2.2. Rechtsmedizinische Fragen.....	2
1.2.3. Rein forensische Fragen .....	3
<b>1.3. Möglichkeiten zur Bestimmung der Leichenliegezeit .....</b>	<b>3</b>
1.3.1. Livores .....	3
1.3.2. Rigor mortis .....	4
1.3.3. Supravitale Reaktionen.....	4
1.3.4. Leichentemperatur .....	5
1.3.5. Späte Leichenerscheinungen .....	7
1.3.6. Das integrative Modell .....	7
<b>1.4. Molekularbiologische Grundlagen.....</b>	<b>9</b>
1.4.1. DNA.....	9
1.4.1.1. Allgemeines .....	9
1.4.1.2. Vorkommen und Bedeutung .....	9
1.4.2. RNA.....	10
1.4.3.1. mRNA .....	11
1.4.3.2. tRNA .....	12
1.4.3.3. rRNA .....	12
1.4.3.4. Sonstige RNA-Gruppen .....	14
1.4.3. Die Kontrolle der Genexpression .....	14
1.4.3.1. Die Kontrolle der Transkription.....	14
1.4.3.2. RNA-Processing.....	15
1.4.3.3. Kontrolle des RNA-Transports.....	15
1.4.3.4. Translationskontrolle .....	15
1.4.3.5. Kontrolle des m-RNA-Abbaus .....	16
1.4.4. Haushalts-Gene.....	16

1.4.4.1. Cyclophilin .....	17
1.4.4.2. GAPDH.....	17
1.4.4.3. ACTB.....	18
1.4.4.4. FASN.....	18
<b>1.5. Zielsetzung.....</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Herkunft und Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Technische Geräte .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3. Glasgefäße .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Plastikgefäße und Einmalprodukte.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5. Reagenzien .....</b>	<b>23</b>
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. RNA-Isolation und -Quantifikation .....</b>	<b>26</b>
3.1.1. RNA-Isolation aus cerebralen Gewebeproben.....	26
3.1.2. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes .....	27
3.1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der Proben .....	27
<b>3.2. Reverse Transkription.....</b>	<b>29</b>
3.2.1. Von der RNA zur cDNA .....	29
3.2.1.1. Oligo-(dT)-Primer .....	29
3.2.1.2. Anker-Primer .....	30
3.2.1.3. Random-Primer .....	31
3.2.2. Reverse Transkription unter Verwendung einer DNase .....	31
3.2.3. Durchführung der Reversen Transkription .....	32
<b>3.3. Amplifikation der cDNA .....</b>	<b>32</b>
3.3.1. Die Polymerasekettenreaktion .....	32
3.3.2. Realtime-PCR.....	34
3.3.2.1. TaqMan-Sonden.....	34
3.3.2.2. SYBR-Green I .....	35

3.3.2.3. Die Realtime-PCR-Fluoreszenz-Kurve .....	35
3.3.2.4. Durchführung der Realtime-PCR.....	36
3.3.2.5. Realtime-PCR: DNA-Nachweis .....	38
<b>3.4. Standardkurven .....</b>	<b>39</b>
3.4.1. Verdünnung der RNA.....	39
3.4.1.1. Reverse Transkription mit Oligo-(dT)-Primern.....	39
3.4.1.2. Reverse Transkription mit Anker-Primern.....	40
3.4.1.3. Reverse Transkription mit Random-Primern .....	40
3.4.2. Verdünnung der cDNA.....	41
<b>3.5. Auswertung.....</b>	<b>42</b>
3.5.1. Die Berechnung der Realtime-PCR-Effizienz .....	42
3.5.2. Relative Quantifizierung mit der $\Delta C_T$ -Methode.....	42
3.5.3. Ausreißerelimination .....	43
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. RNA- bzw. DNA-Gehalt der Proben.....</b>	<b>45</b>
4.1.1. Vergleich des photometrisch bestimmten RNA-Gehalts.....	45
4.1.2. Gelelektrophoretische Darstellung der typischen RNA-	
Banden.....	46
4.1.3. Die Verwendung einer DNase.....	48
4.1.4. DNA-Gehalt der Proben.....	48
<b>4.2. Validierung der RT-PCR-Methodik.....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Konzentrationsvergleich mit RNA comp. Verdünnungs-	
reihen .....	49
4.2.2. Die PCR-Effizienz .....	50
4.2.2.1. Effizienz-Bestimmung bei Standardkurven mit	
RNA-Verdünnung .....	51
4.2.2.2. Effizienz-Bestimmung bei Standardkurven mit	
cDNA-Verdünnung.....	55
<b>4.3. Die Auswirkungen der Leichenliegezeit auf die Realtime-</b>	
<b>    PCR-Ratio .....</b>	<b>56</b>

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1. RNA-Isolation und Stabilität .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2. Amplifikation.....</b>	<b>64</b>
5.2.1. RT-PCR .....	64
5.2.2. Einfluss und Auswirkungen der RT-Primer .....	65
5.2.2.1. Vergleich von Random und Anker Primern .....	65
5.2.2.2. Anker und Random Primer-Differenz .....	68
5.2.3. Die verwendeten Haushaltsgene .....	72
5.2.4. PCR-Effizienz .....	72
<b>5.3. Beziehungen zur Leichenliegezeit .....</b>	<b>73</b>
5.3.1. Das 24-Stunden-Intervall .....	73
5.3.2. Der Verlauf der RNA-Degeneration nach 24 Stunden .....	75
5.3.3. RNA-Degradation in anderen Geweben bzw. anderer Gene.....	77
5.3.4. Ausblick und Bedeutung .....	78
<b>5.4. Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>86</b>
<b>7.1. Leichendaten .....</b>	<b>86</b>
<b>7.2. RNA-Isolationsdaten .....</b>	<b>93</b>
<b>7.3. Realtime-PCR-Ergebniswerte.....</b>	<b>95</b>
<b>7.4. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Einführung in die Thematik

Seit jeher beschäftigt sich die Menschheit mit dem Tod. Die verschiedenen Religionen und spirituellen Gemeinschaften versuchen Antworten auf die Frage zu geben, was mit der Seele des Menschen nach dem Tod geschieht. Auch der vergängliche Körper mit seinen spezifischen postmortalen Veränderungen geriet im Laufe der Zeit immer wieder in den Blickpunkt solcher Betrachtungen. Schon im alten Ägypten wurde versucht, diesen postmortalen Veränderungen des menschlichen Körpers Einhalt zu gebieten. Mit aufwändigen Verfahren wurden die Leichen präpariert, um sie in einem lebensnahen Zustand zu erhalten. All dies geschah in dem Gedanken, dass ein Weiterleben im Jenseits ohne Erhalt des Körpers nicht möglich sei. So verdankt die Archäologie einen großen Teil ihres heutigen Wissensstandes den Entdeckungen oder Ausgrabungen historischer und aussagekräftiger menschlicher Leichen, die entweder durch äußere Einflüsse wie z. B. das Klima oder durch menschliches Zutun in ihrer ursprünglichen Form mehr oder weniger gut erhalten waren.

Doch nicht nur der erhaltene Körper sondern auch die Beobachtung des Verwesungsprozesses wurde schon bald zu einem wichtigen Bestandteil. So finden sich z. B. bereits aus dem 13. Jahrhundert Berichte über die Aufklärung eines Gewaltverbrechens in einem chinesischen Reisfeld mit Hilfe der forensischen Entomologie (Benecke M 1998). Auch in der Gegenwart sind postmortale Vorgänge Gegenstand wissenschaftlich-forensischer Fragestellungen. Und doch ist es jenseits der 24-Stunden-Frist bis heute nicht möglich, eine exakte und präzise Angabe zum postmortalen Intervall zu machen. Die Bestimmung der Leichenliegezeit bleibt ein zentraler Fokus der rechtsmedizinischen Forschung und ist zu einem breiten Feld geworden, das postmortale Veränderungen zeitlich immer genauer einzuteilen und zu interpretieren versucht.

Die gegenwärtige Forschung orientiert sich nicht nur an äußeren, augenscheinlichen Veränderungen der Leiche, sondern bezieht auch die moderne Molekularbiologie mit ein. DNA ist zu einem in der Allgemeinbevölkerung gebräuchlichen Begriff geworden. Durch ihre hohe postmortale Stabilität erlaubt sie sogar die Identifikation von stark verwesenen Leichen und hat einen bedeutenden Stellenwert in der Spurenkunde sowie in der Standeskunde. Aber auch andere molekulare Bausteine, die wie RNA postmortal weniger stabil sind, geraten in den Fokus der Forschung im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang des postmortalen Abbaus mit der Leichenliegezeit.

### **1.2. Die Bedeutung der Leichenliegezeit**

Die Abschätzung, wie lange ein leblos aufgefundener Körper bereits tot ist, kann in vielerlei Hinsicht bedeutsam werden. Das Spektrum reicht hierbei von privat- und standesrechtlichen bis zu kriminalistischen Fragestellungen.

#### **1.2.1. Leichenschau**

Nicht nur in der Rechtsmedizin, sondern auch bei jeder anderen Tätigkeit kann ein Arzt im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Leichenschau, bei der eine zeitliche Angabe des Todeseintritts verlangt wird, mit der Bestimmung der Leichenliegezeit in Kontakt kommen. Wird eine Person tot aufgefunden, ohne dass Zeugen des Todeseintrittes existieren, so muss der die Leichenschau durchführende Arzt versuchen, den Sterbezeitpunkt anhand der klassischen Todeszeichen einzugrenzen. Allerdings sind hierbei die Grenzen der Methodik und unter Umständen die erheblichen rechtlichen Folgen im Auge zu behalten. Genauere Bestimmungen sollten dann dem Rechtsmediziner vorbehalten bleiben.

#### **1.2.2. Rechtsmedizinische Fragen**

Wird bei einem nicht natürlichen Tod die Rechtsmedizin mit einbezogen und handelt es sich z.B. um ein Gewaltverbrechen, so kann der Todeszeitpunkt und



damit die Bestimmung der Leichenliegezeit zu einem bedeutsamen Kriterium für den Ein- oder Ausschluss von Tatverdächtigen und wichtiges Mittel der Beweisführung werden. Die Überprüfung von Alibis ist hier ebenso zu nennen wie die Frage, ob eine Gewalteinwirkung noch einen gewissen Zeitraum überlebt worden war. Der Rechtsmedizin steht hierbei bereits heute eine Anzahl von Verfahren zur Verfügung, die unter geeigneten Umständen zu einer genauen Eingrenzung des postmortalen Intervalls führen können. Eine entsprechende Begutachtung ist daher regelmäßiger Bestandteil rechtsmedizinischer Untersuchungen von Tötungsdelikten.

### **1.2.3. Sonstige rechtliche Fragen**

Rein rechtlich kann die Leichenliegezeit bei erb- oder versicherungsrechtlichen Fragen bedeutsam werden. So ist in nicht seltenen Fällen bei zeitlich eng aufeinander folgendem Todeseintritt eines Ehepaares die Frage, wer zuerst verstorben war, für die Erbfolge entscheidend. Auch die Auszahlung von Versicherungsprämien oder Renten an Hinterbliebene kann so immer wieder Anlass für derartige Fragen geben.

### **1.3. Möglichkeiten zur Bestimmung der Leichenliegezeit**

Neben den mit bloßem Auge sichtbaren Leichenerscheinungen wie Totenflecken oder Totenstarre dienen noch weitere postmortale Vorgänge wie z.B. die Abkühlung des Körperkerns oder die Besiedelung der Leiche mit Insekten bzw. Gliedertieren zur Bestimmung des postmortalen Intervalls. Es folgt eine kurze Erläuterung der einzelnen Methoden.

#### **1.3.1. Livores**

Die Leichenflecken gehören zu den frühesten postmortalen Erscheinungen und bilden sich durch Absinken korpuskulärer Blutbestandteile (Hämostasie) in die abhängigen Körperteile. Bei einer Leiche in Rückenlage ist dies beispielsweise die gesamte Auflagefläche. Ausgespart sind lediglich diejenigen Stellen, an denen der Aufliegedruck größer ist als der hydrostatische Druck.

Zur Bestimmung des postmortalen Intervalls können verschiedene Eigenschaften der Leichenflecken genutzt werden, jedoch variiert diese Erscheinung sehr stark und somit muss von einer alleinigen Betrachtung eher abgeraten werden. Die so genannten Kirchhofrosen können z.B. bereits im Stadium der Agonie auftreten. Im Schnitt treten Leichenflecken 45 min +/- 30 min nach Sistieren des Kreislaufs auf. Während sie zuerst als einzelne abgrenzbare Flecken erscheinen, beginnen sie nach einiger Zeit zu konfluieren (2½ h +/- 1 h). Einen weiteren eingrenzenden Hinweis kann die Wegdrückbarkeit liefern. Hierbei wird mit einem Spatel oder dem Daumen geprüft, ob die rote Verfärbung bei Druckausübung verschwindet, also sich wegrücken lässt. Vollständig gelingt dies im Durchschnitt ab 5½ h +/- 6 h post mortem. Zu späteren Zeitpunkten (17 h +/- 10½ h) ist es trotz stärkerem Druck oder der Verwendung von Hilfsmitteln nicht mehr oder nur eingeschränkt möglich, da es dann bereits zur extravasalen Ausbreitung durch Hämolyse gekommen ist (Madea et al 2003).

### **1.3.2. Rigor mortis**

Die auffälligste Veränderung des menschlichen Körpers nach dem Tod ist die Totenstarre. Mit abnehmender ATP-Konzentration können die Moleküle Aktin und Myosin nicht mehr gegeneinander verschoben werden, so dass die Muskulatur und damit auch die Gelenke in ihrer jeweiligen Position verharren. Da der ATP-Vorrat nicht in allen Muskelfasern gleichzeitig zur Neige geht beginnt die Versteifung nicht schlagartig, sondern entwickelt sich allmählich. Mit einer vollständigen Ausprägung ist nach 8 +/- 1 h zu rechnen. Erst mit dem Einsetzen von Proteolyse und Fäulnis nach einem Intervall von 57 +/- 14 h beginnt sie sich zu lösen. Eine vollständigen Lösung tritt dann nach 76 +/- 32 h ein, jedoch sind all diese Parameter stark von den jeweils vorherrschenden Umgebungsbedingungen und weiteren Faktoren abhängig (Madea et al 2003).

### **1.3.3. Supravitale Reaktionen**

Vor Eintritt des biologischen Todes, also dem Absterben der letzten Körperzelle, sind verschiedene Gewebe noch in der Lage, postmortal auf Stimulation zu

reagieren. Praktische Anwendung findet dieses Phänomen in der mechanischen, elektrischen oder pharmakologischen Erregung der Muskulatur. Grundlage dieser Erscheinung ist eine nach dem Tod noch für einige Zeit ablaufende anaerobe Glykolyse. Zur Bestimmung der Leichenliegezeit wird vor allem die elektrische Erregbarkeit des M. orbicularis oculi, des M. orbicularis oris und die pharmakologische Erregbarkeit des M. sphinkter bzw. dilatator pupillae untersucht, aber auch die mechanische Erregbarkeit der Muskulatur (sog. Idiomuskulärer Wulst). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Zeitverlauf dieser supravitalen Reaktionen (Madea et al 2003).

Tab. 1: Supravitale Reaktionen  
modifiziert nach 32

<b>Getestete Muskulatur</b>	<b>Intervall</b> [ h post mortem]
<b><u>Elektrische Erregbarkeit</u> des <b>M. orbicularis oculi</b>:</b>	
- Oberlid reagiert lokal	5 – 22
- 1/3 - 2/3 des Oberlides reagieren	5 – 16
- ganzes Oberlid reagiert	3,5 – 13
- Ober- und Unterlid reagieren	3 – 8
- Ober-, Unterlid und Stirn reagieren	2 – 7
- Ober-, Unterlid, Stirn und Wange reagieren	1 – 6
<b><u>Elektrische Erregbarkeit</u> des <b>M. orbicularis oris</b></b>	5 - 22
<b><u>Pharmakokogische Erregbarkeit</u> der <b>Pupillenmuskulatur</b>:</b>	
- mittels Noradrenalin	14 – 46
- mittels Acetylcholin	14 – 46

### 1.3.4. Leichentemperatur

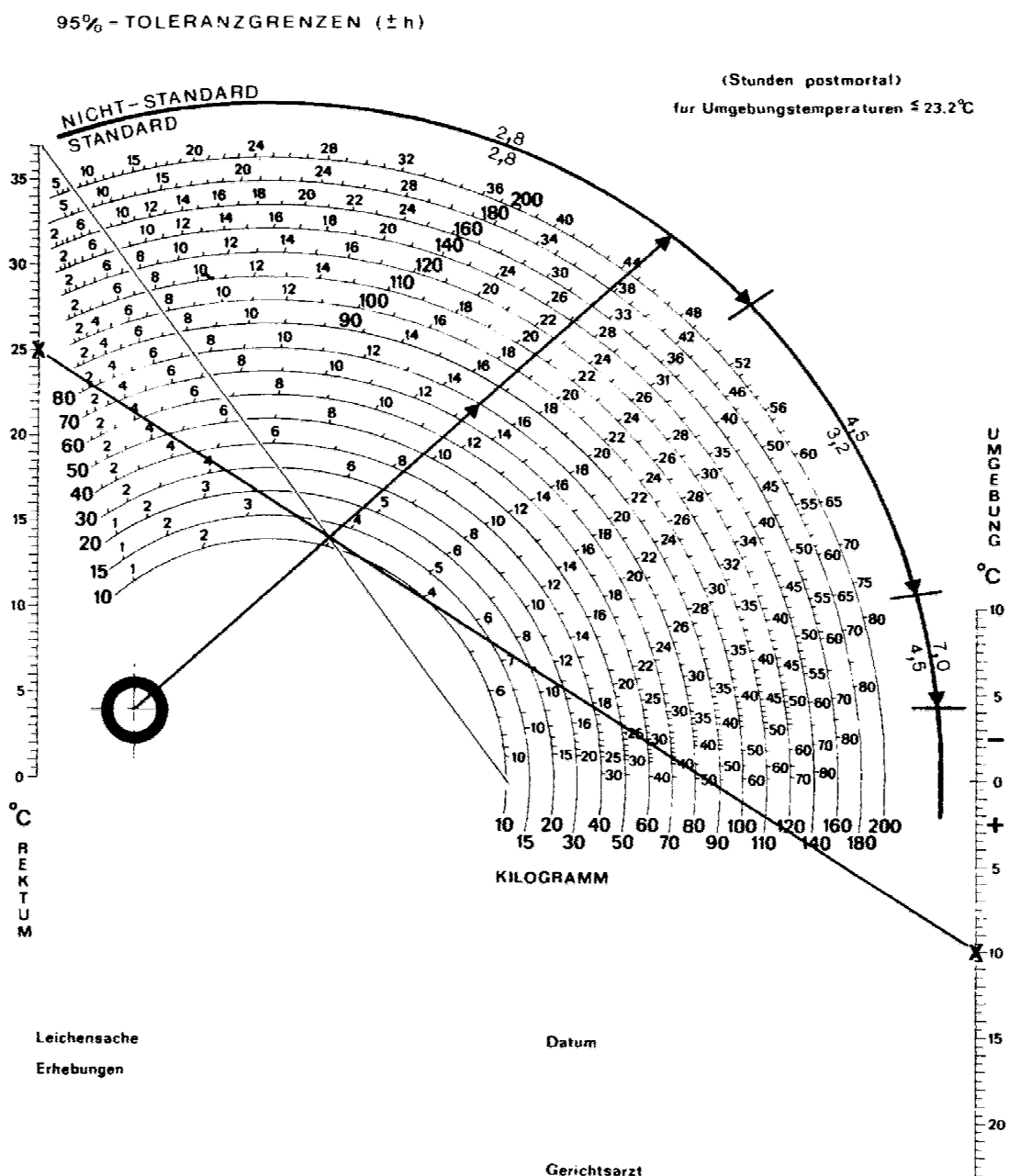
Bei dieser Methode wird versucht, das postmortale Intervall mit Hilfe der Leichenabkühlung (z.B. durch Messen der tiefen Rektaltemperatur, 8 cm oberhalb des M. sphinkter ani) einzugrenzen. Hierbei ist zu beachten, dass die Abkühlung des Körperkerns nach einer Plateauphase von 2 – 3 h exponentiell erfolgt. Für eine grobe Abschätzung wird der Abfall der Körperkerntemperatur

# 1. Einleitung

mit 0,5 – 1,5 °C pro h angegeben. Da jedoch zahlreiche Faktoren Einfluss auf diese Abkühlung nehmen, entwickelte Henßge gestützt auf Untersuchungen an zahlreichen Leichen und auf mathematische Berechnungen ein Nomogramm, das es erlaubt, mit einmaliger Messung der tiefen Rektaltemperatur und der Umgebungstemperatur eine Abschätzung des postmortalen Intervalls unter Berücksichtigung des Körpergewichtes vorzunehmen.

Abb. 1: Rektaltemperatur-Todeszeit-Bezugsnomogramm

aus 32



Hierbei wird in der linken Skala die Rektaltemperatur und in der rechten Skala die Umgebungstemperatur eingetragen. Die beiden Punkte werden durch eine Gerade miteinander verbunden. Es ergibt sich ein Schnittpunkt mit der im Nomogramm vorhandenen Geraden. Die endgültige Gerade, die das Ablesen des Zeitwertes erlaubt, ergibt sich durch das Verbinden dieses Schnittpunktes mit dem Fadenkreuz. Sie schneidet nun alle Viertelkreisbögen, wobei der zutreffende durch das jeweilige Körpergewicht definiert ist. Der äußerste Kreisbogen gibt noch Auskunft über die 95 %-Toleranzgrenzen.

Da sich dieses Verfahren auf unbedeckte Leichen ohne die Abkühlung beeinflussende Parameter (wie z.B. Wind) bezieht, gibt es noch zahlreiche Korrekturfaktoren, die sowohl unterschiedliche Bekleidung als auch äußere Faktoren wie Wetter oder Wasser berücksichtigen und über das dann modifizierte Körpergewicht wirksam werden.

Obwohl es sich bei diesem Verfahren um die am meisten und besten untersuchte Methode zur Bestimmung der Leichenliegezeit handelt kann sie verlässlich nur Intervalle von 5 – 6 h angeben.

### **1.3.5. Späte Leichenerscheinungen**

Durch Beurteilung der Autolyse und Fäulnis einer Leiche kann nur eine sehr grobe Aussage zum postmortalen Intervall gemacht werden wobei dies auch große Erfahrung vom beurteilenden Rechtsmediziner verlangt. Auch hängen diese Veränderungen noch viel stärker mit den vorherrschenden Umgebungsbedingungen zusammen was die so genannte Caspersche Regel deutlich macht:

1 Woche Luft = 2 Wochen Wasser = 8 Wochen Erdgrab

Dennoch gibt es auch hier spezielle Methoden, wie z.B. die Auswertung der Entwicklungszyklen verschiedener Maden bzw. Fliegen, die eine genauere Einordnung versuchen.

### **1.3.6. Das integrative Modell**

Um bei der Bestimmung der Leichenliegezeit ein möglichst kleines und doch zuverlässiges Intervall zu bekommen, werden in der Praxis die Ergebniswerte

# 1. Einleitung

der einzelnen unter 1.3.1. – 1.3.4. vorgestellten Möglichkeiten in einem integrativen Modell zusammengefasst und gemeinsam ausgewertet. So können die Vorteile der einzelnen Methoden am effektivsten ausgenutzt werden. Für die Bestimmung des Anfangswertes des Sterbezeitraumes wird dann der größte Wert, für die des Endpunktes der kleinste Wert ausgewählt.

Abb. 2: Checkliste zum integrativen Modell  
aus 32

<b>FALL:</b>	<b>DATUM:</b>	<b>UHRZEIT: 13.15</b>																																
<b>LIVORES</b>																																		
Beginn	JA <input type="checkbox"/> 0	< 3 <input type="checkbox"/> NEIN	CAVE Anämie Beleuchtung																															
Konfluktion	JA <input checked="" type="checkbox"/> > 1	< 4 <input type="checkbox"/> NEIN																																
Maximum	JA <input type="checkbox"/> > 3	< 16 <input checked="" type="checkbox"/> NEIN																																
Daumendruck	NEIN <input type="checkbox"/> > 1	< 20 <input checked="" type="checkbox"/> JA																																
<b>RIGOR</b>																																		
Beginn	JA <input checked="" type="checkbox"/> > 0.5	< 7 <input type="checkbox"/> NEIN																																
Maximum	JA <input type="checkbox"/> > 2	< 20 <input checked="" type="checkbox"/> NEIN																																
<b>ELEKTRIK</b>																																		
I lokal Oberlid	NEIN <input type="checkbox"/> > 5	< 22 <input type="checkbox"/> JA	CAVE Lidhaematom frisches Lidemphysem lange Agonie																															
II 1/2-2/3 Oberlid	NEIN <input type="checkbox"/> > 5	< 16 <input type="checkbox"/> JA																																
III ganzes Oberlid	NEIN <input type="checkbox"/> > 3.5	< 13 <input type="checkbox"/> JA																																
IV plus Unterlid	NEIN <input type="checkbox"/> > 3	< 8 <input type="checkbox"/> JA																																
V plus Stirn	NEIN <input type="checkbox"/> > 2	< 7 <input checked="" type="checkbox"/> JA																																
VI plus Wange	NEIN <input checked="" type="checkbox"/> > 1	< 6 <input type="checkbox"/> JA																																
O. oris	NEIN <input type="checkbox"/> > 3	< 11 <input checked="" type="checkbox"/> JA																																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">Nomogramm</td> <td style="width: 85%; text-align: center;"> </td> </tr> <tr> <td>Routine</td> <td style="text-align: center;"> </td> </tr> <tr> <td>Ergänzung</td> <td style="text-align: center;"> </td> </tr> </table>			Nomogramm		Routine		Ergänzung																											
Nomogramm																																		
Routine																																		
Ergänzung																																		
<table style="width: 100%;"> <tr> <td>idiomuskulärer Wulst</td> <td>NEIN <input type="checkbox"/> &gt; 15</td> <td>&lt; 2.5 <input type="checkbox"/> JA</td> <td>Sehnenphänomen</td> </tr> <tr> <td>Liv.vollst.verlagerbar</td> <td>NEIN <input type="checkbox"/> &gt; 2</td> <td>&lt; 6 <input type="checkbox"/> JA</td> <td>Liv.vollst.verlagerbar</td> </tr> <tr> <td>Rigor Wiederbildung</td> <td>NEIN <input type="checkbox"/> &gt; 2</td> <td>&lt; 8 <input checked="" type="checkbox"/> JA</td> <td>Rigor Wiederbildung</td> </tr> <tr> <td>Atropin/Cyclopent.</td> <td>NEIN <input type="checkbox"/> &gt; 3</td> <td>&lt; 10 <input type="checkbox"/> JA</td> <td>Atropin/Cyclopent.</td> </tr> <tr> <td>Liv.unvollst.verlagerb.</td> <td>NEIN <input type="checkbox"/> &gt; 4</td> <td>&lt; 13 <input type="checkbox"/> JA</td> <td>idiomuskulärer Wulst</td> </tr> <tr> <td>Mydriaticum Roche</td> <td>NEIN <input type="checkbox"/> &gt; 5</td> <td>&lt; 24 <input type="checkbox"/> JA</td> <td>Liv.unvollst.verlagerb.</td> </tr> <tr> <td>Acetylcholin</td> <td>NEIN <input type="checkbox"/> &gt; 14</td> <td>&lt; 30 <input checked="" type="checkbox"/> JA</td> <td>Mydriaticum Roche</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>&lt; 46 <input type="checkbox"/> JA</td> <td>Acetylcholin</td> </tr> </table>			idiomuskulärer Wulst	NEIN <input type="checkbox"/> > 15	< 2.5 <input type="checkbox"/> JA	Sehnenphänomen	Liv.vollst.verlagerbar	NEIN <input type="checkbox"/> > 2	< 6 <input type="checkbox"/> JA	Liv.vollst.verlagerbar	Rigor Wiederbildung	NEIN <input type="checkbox"/> > 2	< 8 <input checked="" type="checkbox"/> JA	Rigor Wiederbildung	Atropin/Cyclopent.	NEIN <input type="checkbox"/> > 3	< 10 <input type="checkbox"/> JA	Atropin/Cyclopent.	Liv.unvollst.verlagerb.	NEIN <input type="checkbox"/> > 4	< 13 <input type="checkbox"/> JA	idiomuskulärer Wulst	Mydriaticum Roche	NEIN <input type="checkbox"/> > 5	< 24 <input type="checkbox"/> JA	Liv.unvollst.verlagerb.	Acetylcholin	NEIN <input type="checkbox"/> > 14	< 30 <input checked="" type="checkbox"/> JA	Mydriaticum Roche			< 46 <input type="checkbox"/> JA	Acetylcholin
idiomuskulärer Wulst	NEIN <input type="checkbox"/> > 15	< 2.5 <input type="checkbox"/> JA	Sehnenphänomen																															
Liv.vollst.verlagerbar	NEIN <input type="checkbox"/> > 2	< 6 <input type="checkbox"/> JA	Liv.vollst.verlagerbar																															
Rigor Wiederbildung	NEIN <input type="checkbox"/> > 2	< 8 <input checked="" type="checkbox"/> JA	Rigor Wiederbildung																															
Atropin/Cyclopent.	NEIN <input type="checkbox"/> > 3	< 10 <input type="checkbox"/> JA	Atropin/Cyclopent.																															
Liv.unvollst.verlagerb.	NEIN <input type="checkbox"/> > 4	< 13 <input type="checkbox"/> JA	idiomuskulärer Wulst																															
Mydriaticum Roche	NEIN <input type="checkbox"/> > 5	< 24 <input type="checkbox"/> JA	Liv.unvollst.verlagerb.																															
Acetylcholin	NEIN <input type="checkbox"/> > 14	< 30 <input checked="" type="checkbox"/> JA	Mydriaticum Roche																															
		< 46 <input type="checkbox"/> JA	Acetylcholin																															
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 40%;">ENDERGEBNIS</td> <td style="width: 30%; text-align: center;"><input type="text" value="4.8"/></td> <td style="width: 30%; text-align: center;"><input type="text" value="7"/></td> </tr> <tr> <td>TODESZEIT</td> <td style="text-align: center;">zwischen <input type="text" value="6.15"/> und</td> <td style="text-align: center;"><input type="text" value="8.30"/></td> </tr> </table>			ENDERGEBNIS	<input type="text" value="4.8"/>	<input type="text" value="7"/>	TODESZEIT	zwischen <input type="text" value="6.15"/> und	<input type="text" value="8.30"/>																										
ENDERGEBNIS	<input type="text" value="4.8"/>	<input type="text" value="7"/>																																
TODESZEIT	zwischen <input type="text" value="6.15"/> und	<input type="text" value="8.30"/>																																

### **1.4. Molekularbiologische Grundlagen**

#### **1.4.1. DNA**

##### 1.4.1.1. Allgemeines

1953 entdeckten die beiden Forscher Watson und Crick, dass die DNA in jeder Zelle als Doppelhelix vorliegt, nachdem Avery sie zuvor schon als Träger der genetischen Information identifiziert hatte. Mit dieser Erkenntnis rückte das heute so bedeutende Molekül immer mehr in den Blickpunkt der modernen Wissenschaft.

Bei der DNA handelt es sich um ein Polymer aus Desoxyribonukleotiden, die jeweils aus einem Zucker, der Desoxyribose, einer Phosphatgruppe und einer Base bestehen. Während Zucker und Phosphat konstant sind, gibt es 4 verschiedene Basen: Adenin und Guanin aus der Gruppe der Purine, sowie Thymin und Cytosin aus der Gruppe der Pyrimidine. Die einzelnen Desoxyribonukleotide sind über Phosphodiesterbindungen verbunden, die jeweils eine 3'-OH-Gruppe einer Desoxyribose mit einer 5'-OH-Gruppe eines weiteren Zuckermoleküls mit Hilfe des Phosphats verknüpfen und somit jedem Strang Polarität verleihen. In der Doppelhelix, also der doppelsträngigen DNA-Formation, sind immer 2 Basen über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden, wobei Adenin mit Thymin unter der Bildung von 2 Wasserstoffbrücken und Guanin mit Cytosin unter der Bildung von 3 Wasserstoffbrücken aneinander gelagert sind.

Die Reihenfolge der Basenanordnung in einem Strang gibt den genetischen Code wieder, wobei immer 3 Basen für eine Aminosäure stehen.

Insgesamt besteht das menschliche Genom aus 2.900.000.000 Basenpaaren, was einer Länge von 990.000 µm im haploiden Satz entspricht.

##### 1.4.1.2. Vorkommen und Bedeutung

Die DNA ist mit wenigen Ausnahmen essentieller Bestandteil einer jeden Zelle, da sie die Information für den Aufbau der Proteine enthält. Jede Zelle ist in der Lage den DNA-Strang bei der Zellteilung zu verdoppeln, so dass jede

Tochterzelle wieder zum Proteinaufbau befähigt ist. Dieser Aufbau wird jedoch nicht durch die DNA selbst, sondern durch Kopien (RNA) vermittelt.

Einen zentralen Stellenwert besitzt die DNA somit bei vererbaren Krankheiten, die sich durch verschiedenste Abweichungen in der Zusammensetzung des genetischen Codes begründen. Z.B. können dann verschiedene Proteine gar nicht oder nur stark abgewandelt hergestellt werden.

Durch DNA-Rekombination können neuartige Proteine, z.B. Antikörper konstruiert werden, die den verschiedensten gewünschten Aufgaben nachgehen. Es können transgene Tiere und Pflanzen hergestellt werden, die in der modernen Wissenschaft z.B. als Vergleichsorganismen dienen, indem sie humane Krankheitsbilder imitieren.

Doch auch in der forensischen Medizin ist dieses Molekül sehr bedeutsam. In nicht codierenden Abschnitten, den sog. Introns befinden sich kurze Wiederholungseinheiten von Basengrundmustern (VNTRs; variable number of tandem repeats), die es erlauben ein jedes Individuum zu identifizieren. Die Anzahl der Wiederholungen variiert an den verschiedenen Loci zwischen 4-40, weshalb diese Abschnitte auch als hypervariable Mikrosatelliten-Sequenzen bezeichnet werden. Hierbei genügen bereits wenige Zellen, z.B. aus Blut, Hautschüppchen, Speichel oder Haarwurzeln um eine exakte Zuordnung zu erhalten.

### **1.4.2. RNA**

In allen menschlichen Zellen herrscht zu jedem Zeitpunkt ein hoher Bedarf und Umsatz an Proteinen, die nötig sind, um den Zellstoffwechsel aufrecht zu erhalten und die spezifischen Aufgaben des jeweiligen Zelltyps zu erfüllen. Um die in der DNA enthaltenen Informationen umzusetzen sind verschiedene Hilfsmoleküle nötig. Eine wichtige Gruppe stellt hierbei die RNA mit ihren wichtigsten Untergruppen mRNA, tRNA und rRNA dar, die Abschriften der DNA darstellen.

In eukaryonten Zellen findet man zu 80 % rRNA, zu 15-20 % tRNA und zu ca. 3 % mRNA.



Von der DNA unterscheidet sich die RNA durch ein anderes Zuckermolekül, der Ribose und durch die Verwendung einer anderen Base: Uracil anstelle von Thymin. In menschlichen Zellen liegt die RNA als einsträngiges Molekül vor, das Genom einiger Viren besteht allerdings auch aus doppelsträngiger RNA. Diese Einsträngigkeit erlaubt der RNA, sich unter Umständen zu komplexen dreidimensionalen Strukturen zu falten, die sogar katalytische oder strukturelle Funktionen übernehmen können.

Mittlerweile geht die moderne Wissenschaft sogar davon aus, dass die RNA bereits vor der DNA entstanden ist und somit der ursprüngliche Träger der genetischen Information war (Alberts et al 2004).

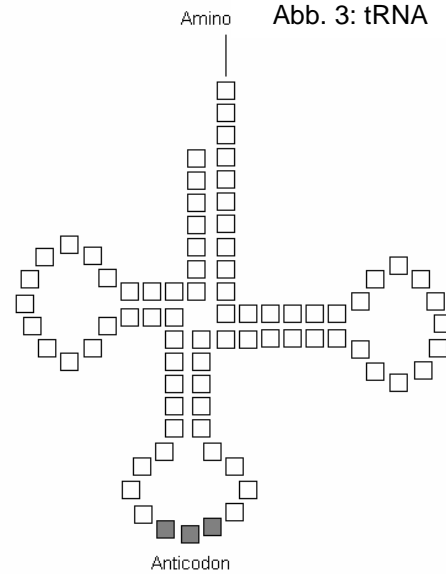
### 1.4.2.1. mRNA

Bei der mRNA (messenger RNA) handelt es sich um einen komplementär zu einem DNA-Abschnitt synthetisierten RNA-Einzelstrang, der die Information für den Aufbau eines bestimmten Proteins enthält. Dieser Vorgang des Abschreibens oder Kopierens wird als Transkription bezeichnet.

Nachdem ein kleiner Abschnitt der Doppelhelix durch eine Topoisomerase eröffnet wurde, kann die RNA-Polymerase an bestimmten Promotorregionen ansetzen. Diese RNA-Polymerase ist ein Enzym, das nach den Vorgaben eines DNA-Stranges einen komplementären RNA-Strang in 5'-3'-Richtung synthetisieren kann. Sie katalysiert die Bildung von Phosphodiesterasebindungen und benötigt als Substrate die energiereichen Nucleosidtriphosphate ATP, UTP, CTP und GTP. Sobald das 5'-Ende und einige Nucleotide hergestellt wurden, synthetisieren Enzyme auf der Polymerase ein ‚cap‘, das ein verändertes Guaninnucleotid ist und das an das 5'-Ende angefügt wird. Ebenfalls bereits während Synthese werden nicht kodierende Abschnitte, so genannte Introns, die immer wieder die codierenden Bereiche unterbrechen durch Spleißosomen entfernt. Gelangt die RNA-Polymerase an eine DNA-Region die als Terminationsregion fungiert, wird an das 3'-Ende durch die Poly-A-Polymerase ein Poly-A-Schwanz angefügt und die fertige mRNA entlassen.

### 1.4.2.2. tRNA

Bei den tRNA-Molekülen handelt es sich um einsträngige RNA-Gebilde, die wie die mRNAs von einer Polymerase hergestellt werden. Sie sind dazu befähigt, Aminosäuren zu transportieren, zweidimensional kleeblattförmig darstellbar und verfügen über eine wichtige Sequenz, die sich ungefähr in der Mitte befindet, das Anticodon. Es besteht aus 3 Basen, die die komplementäre Sequenz zu der Sequenz der am 3'-Ende hängenden Aminosäure bilden. In jeder Zelle gibt es spezielle Enzyme, die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die an die jeweiligen tRNAs die zum Anticodon passende Aminosäure anhängen.



### 1.4.2.3. rRNA

Die ribosomale RNA (rRNA) wird ebenfalls wie die mRNA von einer bestimmten RNA-Polymerase transkribiert, sie besitzt jedoch kein ‚cap‘ am 5'-Ende und auch keinen Poly-A-Schwanz. Verschiedene rRNAs bilden dann zusammen mit anderen Molekülen das Ribosom, dessen Aufgabe es ist, mittels der Informationen der mRNAs die jeweiligen Proteine aufzubauen. Eukaryote Zellen verfügen über 80S Ribosomen, wobei S für die Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge steht. Sie lassen sich in 2 Untereinheiten aufteilen, ein 60S-Molekül und ein 40S-Molekül.

Die große 60S-Untereinheit besteht wiederum aus einer 5S rRNA (120 Nucleotide), einer 28S rRNA (4700 Nucleotide) einer 5,8S rRNA (160 Nucleotide) und 49 Proteinen. Ihre Aufgabe besteht in der Katalyse der Peptidbindung, wodurch die einzelnen Aminosäuren zu einer Kette verbunden werden.

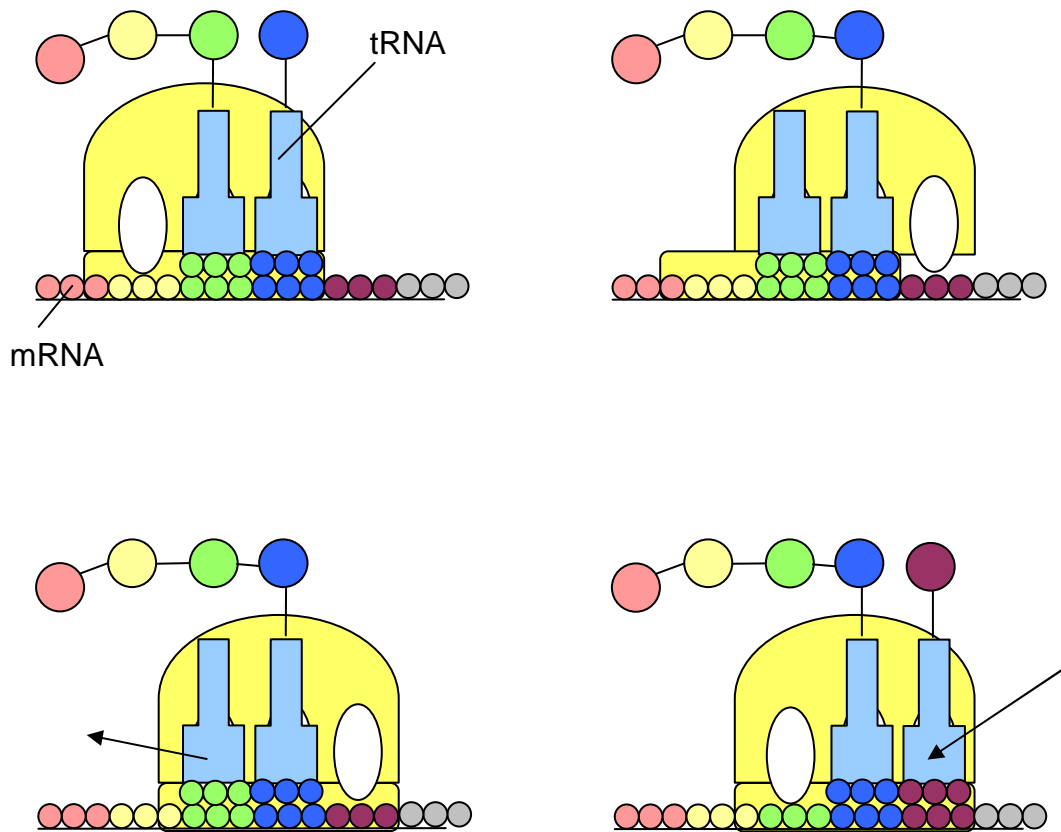
Die kleinere Untereinheit (40S) setzt sich aus einer 18S rRNA (1900 Nucleotide) und ca. 33 Proteinen zusammen und enthält die Bindungsstellen für die mRNA und die jeweiligen tRNAs.

## 1. Einleitung

---

Bindet nun eine mRNA an einem Ribosom, so können immer 2 der 3 Bindungsstellen für tRNAs besetzt werden. Die tRNAs müssen jedoch mit ihrem Anticodon komplementär zu den Codons der mRNA sein. Sind alle Bedingungen erfüllt, so verknüpft das Ribosom die beiden Aminosäuren und die erste tRNA wird „leer“ entlassen. Dabei verändert das Ribosom seine Konformation, so dass nach der 2. tRNA eine weitere andocken kann. Diese Umwandlung der mRNA Information in ein fertiges Protein wird als Translation bezeichnet.

Abb. 4: Translation  
modifiziert nach 2



### 1.4.2.4. Sonstige RNA-Gruppen

Außer diesen 3 großen RNA-Spezies gibt es noch einige kleinere RNA-Gruppen, die weitere wichtige Funktionen im zellulären Organismus übernehmen. snoRNAs (small nucleolar RNAs) befinden sich im Nucleolus und sind an der korrekten Herstellung der rRNAs beteiligt. snRNAs (small nuclear RNAs) sind wichtige Bestandteile des Zellkerns und übernehmen dort Aufgaben wie z.B. das Spleißen der noch unreifen mRNA. Des Weiteren beteiligen sich RNAs an der Telomersynthese, an verschiedenen Transportvorgängen sowie an der Inaktivierung des X-Chromosoms.

### 1.4.3. Die Kontrolle der Genexpression

Die Kontrollfaktoren der Genexpression sind sehr vielfältig und setzen an verschiedenen Punkten der Informationsübertragung von DNA zu Proteinen an. Da jede Zelle über die komplette genetische Information verfügt, ist das Vorhandensein von Regulationsmechanismen von essentieller Bedeutung, um den unterschiedlichen Zelltypen die Ausführung ihrer spezifischen Aufgaben zu ermöglichen.

#### 1.4.3.1. Die Kontrolle der Transkription

Die RNA-Polymerase II transkribiert alle proteincodierenden Gene während sich die beiden anderen RNA-Polymerasen (RNA-Polymerase I und RNA-Polymerase III) um die Herstellung von tRNAs, rRNAs und einiger kleinerer RNA Gruppen kümmern. Diese RNA-Polymerase II ist nun nicht in der Lage allein an einen DNA-Abschnitt zu binden, sondern benötigt dafür zahlreiche Transkriptionsfaktoren. Der folgende Abschnitt skizziert einen möglichen Ablauf einer kontrollierten Transkription.

Die erste Instanz bilden Genaktivatoren, die an einen DNA-Abschnitt binden, der unter Umständen viele Basenpaare vom entsprechenden Gen entfernt liegt und Enhancer genannt wird. Die Aufgabe dieser Aktivatoren besteht darin, alle nötigen Transkriptionsfaktoren sowie die RNA-Polymerase II anzulocken und die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Transkription zu schaffen. Damit die

Genaktivatoren Kontakt zur Promotorregion bekommen, kann die DNA eine Schleife bilden.

Des Weiteren befindet sich ca. 25 Basenpaare vor der Promotorregion die TATA-Box. Es handelt sich um eine Region die reich an T- und A- Nukleotiden ist und die die Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren (TFII) der RNA-Polymerase II darstellt. Die Transkriptionsfaktoren unterstützen nun die RNA-Polymerase bei der Bindung an den Promotor. Sind nun alle Bindungsstellen besetzt, kann die Transkription beginnen.

Soll eine Transkription nicht oder nur wenig stattfinden, so gibt es entsprechende Repressor-Proteine, die die jeweiligen Bindungsstellen besetzen können.

### 1.4.3.2. RNA-Processing

Durch alternatives Spleißen können aus einer einzigen mRNA viele verschiedene Proteine entstehen. Da die Spleißosomen selbst nicht erkennen können, welche Spleiß-Stellen zu welchen Proteinen gehören, gibt es auch hier wieder regulatorische Proteine, Repressor- und Aktivatorproteine, die Wegweisende Funktionen übernehmen.

### 1.4.3.3. Kontrolle des RNA-Transports

Damit die fertige mRNA translatiert werden kann, muss sie aus dem Zellkern hinaus zu den Ribosomen transportiert werden. Zuvor wird sie jedoch von einem sich im Zellkern befindenden Exosom kontrolliert. Wird ein Fehler entdeckt oder haben an die mRNA Proteine gebunden, die ein ordentliches RNA-Processing verhindert haben, so wird sie von den RNA-Exonuklease-Untereinheiten des Exosoms abgebaut.

### 1.4.3.4. Translationskontrolle

Um mit der Translation beginnen zu können, sucht die kleine Untereinheit des Ribosoms das Startcodon AUG, welches sich in der Nähe des 5'-Endes befindet. Eine mögliche Version zur Verhinderung der Translation liefern so

genannte Translationsrepressoren. Sie binden an das 5'-Ende der mRNA und verstecken somit das Startcodon, so dass das Ribosom keinen Anfang findet.

### 1.4.3.5. Kontrolle des mRNA-Abbaus

Jedoch gibt es auch Möglichkeiten einer positiven Kontrolle. Der Poly-A-Schwanz einer jeden mRNA wird im Cytosol andauernd verkürzt (Decapping). Mit dem Verlust ihres Poly-A-Schwanzes wird die mRNA sofort abgebaut. Moleküle, die nun die Fähigkeit besitzen, diesen Poly-A-Schwanz zu elongieren, können das Leben einer mRNA und damit die Anzahl ihrer Translationen verlängern.

### 1.4.4. Haushalts-Gene

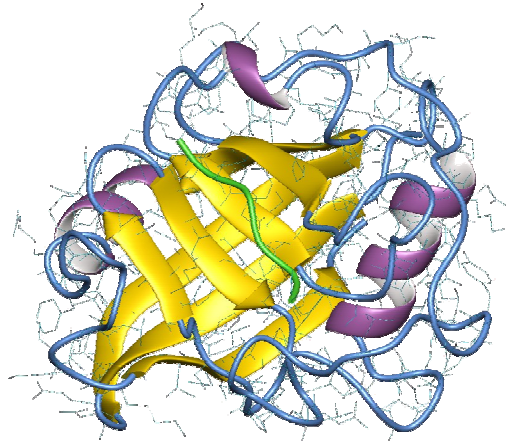
Unter den Haushalts-Genen bzw. Housekeeping-Genes versteht man Gene, deren Proteine ein unabdingbarer Bestandteil des zellulären Lebens sind. Sie sind also nicht für spezielle Aufgaben einzelner Gewebe zuständig, sondern beteiligen sich an Vorgängen wie z.B. Energiegewinnung, Aufbau des Zytoskeletts usw., die für die grundlegende Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels nötig sind. Im Gegensatz zur kontrollierten Genexpression haben diese Gene keine TATA-Box, sondern verfügen über so genannte CG-Inseln, die die Promotorregionen umgeben. Es handelt sich um unmethylierte DNA-Abschnitte, die nur aus C- und G-Nukleotiden bestehen. An derartige Inseln kann nun z.B. der Zinkfinger-Faktor Sp1 binden und so die Transkription aktivieren.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Haushalts-Gene kurz vorgestellt werden.

### 1.4.4.1. Cyclophilin

Bei dem Protein, für das das Haushaltsgen Cyclophilin codiert, handelt es sich um eine Peptidyl-Prolyl Cis-Trans-Isomerase. Es katalysiert also die Cis-Trans-Isomerisation von verschiedenen Proteinen, kann sowohl in freier Form als auch gebunden vorkommen und verfügt über verschiedene Isoformen. Das aus 164 Aminosäuren bestehende Molekül kommt in nahezu allen Geweben vor und wurde im Zuge der Evolution kaum verändert, weshalb sich auch heute noch in vielen Säugetieren identische Formen finden. Im Organismus bindet Cyclophilin das Immunsuppressivum Cyclosporin.

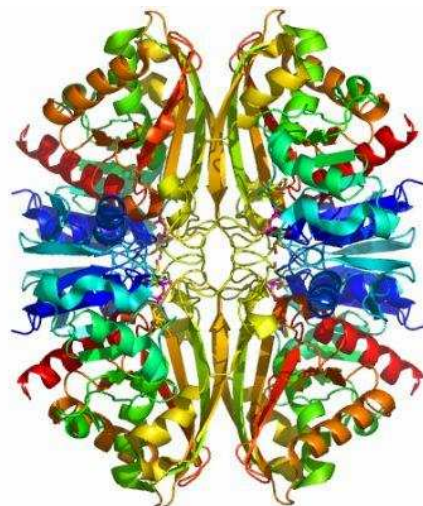
Abb. 5: Cyclophilin  
aus [160.114.99.91/astrojan/prot1t.htm](http://160.114.99.91/astrojan/prot1t.htm)



### 1.4.4.2. GAPDH

Bei GAPDH oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase handelt es sich um ein Enzym welches vor allem für seine glykolytische Funktion bekannt ist. Es katalysiert die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat unter der Bildung einer energiereichen Phosphatverbindung ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ). Jedoch soll dieses Molekül noch in viele weitere zelluläre Vorgänge involviert sein, wie z.B. der Membranfusion, dem RNA-Transport aus dem Zellkern, der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur.

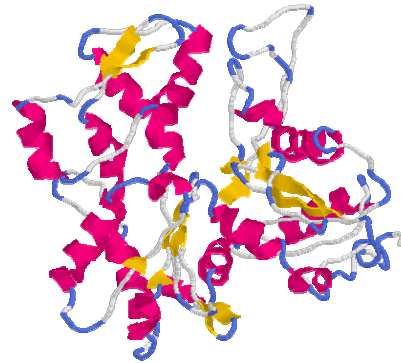
Abb. 6: GAPDH  
aus <http://sgc.utoronto.ca/SGCWebPages/StructureDescription/1Z9Q.php>



### 1.4.4.3. ACTB

ACTB oder Beta-Actin ist eine der 6 humanen Isoformen der Actin-Proteine, deren Aminosäure-Sequenzen nur wenig differieren. Die Actine beteiligen sich am Aufbau des Zytoskeletts und sind einer der Hauptbestandteile für eine erfolgreiche Muskelkontraktion. Alle Actin-Monomere besitzen eine Bindungsstelle für ATP bzw. ADP und lagern sich zu Filamenten zusammen. Jeweils 2 dieser Proteofilamente winden sich in Form einer rechtsdrehenden Schraube umeinander und können durch die so gewonnene Stabilität z.B. die Form der Zelloberfläche festlegen.

Abb. 7: Actin  
aus [http://biophysics.bumc.bu.edu/images/courses/actin\\_domains.gif](http://biophysics.bumc.bu.edu/images/courses/actin_domains.gif)



### 1.4.4.4. FASN

Die Fettsäuresynthase (FASN) ist ein Multienzymkomplex, der sich im Cytosol einer jeden eukaryonten Zelle befindet und für die Bildung von Palmitat (C16) zuständig ist. Palmitat ist notwendiger Baustein für den Aufbau aller längerkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, die wiederum zur Synthese von Phospho- und Glykolipiden, von Brennstoffen, von Hormonen oder von intrazellulären Botenstoffen benötigt werden. Als Ausgangssubstrate dienen die beiden C2-Donatoren Acetyl-CoA und Malonyl-CoA. Insgesamt handelt es sich bei der Fettsäuresynthase um ein Dimer aus 2 identischen Ketten, die jeweils in 3 aktive Domänen gefaltet sind. Jede dieser Domänen enthält eine oder mehrere enzymatisch aktive Einheiten: Die Domäne 1 enthält die Acetyl- und die Malonyl-Transferase, sowie die  $\beta$ -

Abb. 8: FASN  
aus <http://campus.murraystate.edu/academic/faculty/ricky.cox/pi/330/1mlaoverall.GIF>





Ketoacyl-Synthase; die Domäne 2 enthält das Acyl-Carrier-Protein, die  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase, die Dehydratase und die Enoyl-Reduktase; die Domäne 3 enthält die Thioesterase. Die Form des Multienzymkomplexes erlaubt durch die kurzen Diffusionswege und seine hohe Stabilität eine effizientere Syntheseleistung.

### **1.5. Zielsetzung**

Nach dem Tod des Menschen bleibt seine DNA für lange Zeit erhalten und ist damit zu einem zentralen Marker bei der Identifikation von z.B. stark verwesenen Leichen geworden. Ebenso kann die Auswertung von bis Jahrzehnte altem Spurenmaterial noch Täter überführen.

Viele Untersuchungen haben bereits früh gezeigt, dass RNA nicht über eine derartige postmortale Stabilität verfügt, sondern dass sie unter bestimmten Bedingungen sogar sehr rasch abgebaut wird. Ursächlich sind hier vor allem Ribonucleasen beteiligt, die prinzipiell ubiquitär vorhanden sind, aber vor allem in Organen wie Leber oder Pancreas zu einem sehr schnellen RNA-Abbau führen.

Jedoch wurde in einigen Studien auch recht schnell deutlich, dass dieser Abbau im Gehirn deutlich langsamer vonstatten geht, wodurch dieses Gewebe zum Ansatzpunkt dieser Arbeit wurde.

Ziel dieser Arbeit war es nun, RNA aus cerebralem Material zu isolieren und mit molekularbiologischen Methoden aufzuarbeiten. Mittels reverser Transkription und Realtime-PCR soll eine Vorgehensweise etabliert werden, die es erlaubt, RNA zuverlässig zu quantifizieren. Gelingt dies, so stellt sich die Frage, ob die RNA-Degradation eine Abhängigkeit vom postmortalen Intervall zeigt und ob eine derartige Vorgehensweise eventuell einen Beitrag zur Bestimmung der Leichenliegezeit liefert.

Doch nicht nur in der Rechtsmedizin ist eine derartige Quantifikation möglicherweise von Interesse. Auch die Erforschung neuer oder in ihrer Pathogenese ungeklärter Erkrankungen des zentralen Nervensystems können durch eine derartige Vorgehensweise Unterschiede in der Expression von

## 1. Einleitung

---

Proteinen aufdecken. Durch das Bekanntwerden der molekularen Ätiologie können dann gezielte Therapieoptionen entwickelt und angewandt werden.

## **2. MATERIAL**

### **2.1. Herkunft und Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials**

Bei dem verwendeten Material handelt es sich um einen Anteil des parietalen Hirngewebes, das bei rechtsmedizinischen Obduktionen mit Zustimmung des Auftraggebers zurückbehalten wurde. Insgesamt bezieht sich diese Arbeit auf  $n = 45$  Leichen, bei denen Material entnommen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei  $-40\text{ °C}$  gelagert wurde. Es wurde darauf geachtet, dass bei den verwendeten Leichen das postmortale Intervall möglichst genau bekannt war. Der Mittelwert dieses Zeitraumes liegt bei  $t = 48 \pm 1$  h, die längste Leichenliegezeit beträgt  $t = 96$  h und die kürzeste  $t = 7$  h. Ebenso wurden alle Leichen nach Eintritt des Todes ohne größere Verzögerungen in den Kühlraum des Institutes verbracht und dort bis zur Obduktion gelagert. Beim Vorliegen schwerer Kopfverletzungen oder anderer cerebraler Auffälligkeiten wurden die entsprechenden Leichen von den Untersuchungen ausgeschlossen. Es handelt sich um insgesamt 16 weibliche und 29 männliche Verstorbene, deren mittleres Lebensalter  $48,1 \pm 19,9$  Jahre beträgt, der älteste mit 87 Jahren, der jüngste mit 6 Monaten. Die entnommenen Proben wurden fortlaufend nummeriert, wobei sich ungerade Probennummern auf Anteile aus der parietalen Hirnrinde und gerade Probennummern auf Anteile des parietalen Hirnmarkes beziehen.

### **2.2. Technische Geräte**

- Ableitgerät - *PEQLAB: Consort Power Supply E122*
- Dampf-Autoklav - *Melag: Typ 23*
- Eismaschine - *Simag: SPR 80*
- Gefrierschrank - *Liebherr: Premium (-18°C)*
- Gefriertruhe - *Genheimer: REVCO (-41°C)*
- Kühlzentrifuge - *Hettich: Universal 32R*
- Photometer - *Eppendorf: Biophotometer*
- Pipetten - *Roth: 100-1000 µl*

## 2. Material

---

- Eppendorf: Pipetman P10, P20, P100, P200
- Polariod Kamera - Padova: CRT Instant Camera TA40
- Realtime-PCR - Applied Biosystems: ABI Prism 7000 Sequence  
Detection System
- Thermocycler - Biotron: Biometra
- Transilluminator - Hartenstein: UVP
- Vortexer - Hartenstein: Labinco L46
- Waage - Mettler: AE50
- Wasserbad - Lauda: Typ B Nr. 534029
- Zentrifuge - Hettich: Mikroliter Nr. 1394

### **2.3. Glasgefäße**

- Bechergläser - Schott: Duran 1000 ml, 250 ml
- Homogenisator - Hartenstein: Homogenisator mit Kolben 2 ml
- Messzylinder - Brand: 500 ml
- Vakuumextraktor - Hartenstein: Exsikkator

### **2.4. Plastikgefäße und Einmalprodukte**

- Gewebekulturschalen - Hartenstein: 100 x 15 mm
- Handschuhe - Roth: Rotiprotect - Latex
- Küvetten - Eppendorf: UVette 220 - 1600 nm
- Laufkammer - Renner GmbH: 220 V - 50 Hz
- Pipettenspitzen - Sarstedt: Biosphere Filter Tips 10 µl, 20 µl, 100 µl,  
1000 µl
- Reaktionsgefäße - Eppendorf: 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml
- Realtime-PCR Platten - Applied Biosystems: Thermo-Fast® Detection  
Plate AB - 1100
- Realtime-PCR Platten-Abdeckung - Applied Biosystems: Absolute QPCR  
Seal AB - 1170
- Sterile Skalpellklingen - Bayha

## 2. Material

---

- Zentrifugenröhrchen - *Hartenstein: 50 ml*

### 2.5. Reagenzien

#### RNA-Isolation:

- Total RNA Isolation System - *Promega: RNAgents®:*
  - *Phenolchloroform Isoamyl Alkohol*
  - *RNAgents® Denaturing Solution*
  - *Sodium Acetat, 2M*
  - *Isopropanol*
  - *Nuclease Free Water*

#### Reverse Transkription:

- Reverse Transkriptase - *Fermentas: Revert Aid™ M-Mul V Reverse Transkriptase 200 µl / 10000 u*
- Puffer - *Fermentas: Buffer for M-Mul V RT 1,0 ml*
- Nukleotide - *PEQLAB: 5 mmol aus dGTP, dCTP, dATP, dTTP*
- RNase Inhibitor - *Fermentas: 40 u/µl, 1000 u*
- RT-Primer - *Promega: Random Primers 20 µg , 500 µg/ml*
  - *MWG Biotech AG: Oligo(dT) 15*
  - *MWG Biotech AG: Oligo(dT) - G*
  - *MWG Biotech AG: Oligo(dT) - A*
- Desoxyribonuklease - *Fermentas: DNase (RNase free), 1 u/µl 1000 u*

#### RNAs:

- Competitive RNA - *Ambion: Cyclophilin Armored RNA aus RT-Check™ RT-PCR Sample and Procedure Control Kit*
- Standard RNA - *Ambion: Human Brain Total RNA 100µg (1mg/ml)*

#### Realtime-PCR:

- Reaktionsansatz für die Realtime-PCR
  - *Applied Biosystems: Absolute SYBR Green ROX Mix*

- Realtime-PCR Primer
  - *Cyclophilin:wild*  
Sense Primer (5'-3'): CCA TCG TGT AAT CAA GGA CTT CAT  
Antisense Primer (5'-3'): CTT GCC ATC CAG CCA GGA GGT  
CTT
  - *Cyclophilin: comp. - Ambion: RT-Check™ RT-PCR Sample and  
Procedure Control Kit*
  - *GAPDH: Applied Biosystems, Hs 99999905\_m1*
  - *ACTB: Applied Biosystems, Hs 99999903\_m1*
  - *GAPDH2: Applied Biosystems, Sequenzen:*  
Sense Primer (5'-3'): GTG GAA GGA CTC ATG ACC ACA GTC  
Antisense Primer (5'-3'): GTG GTG GAC CTC ATG GCC CAC  
ATG
  - *FASN1: Applied Biosystems, Sequenzen:*  
Sense Primer (5'-3'): ATC CGC TCG TTG TAC CAG TC  
Antisense Primer (5'-3'): GAT CT CAG GGT TGG GGC TAT
  - *FASN4: Applied Biosystems, Sequenzen:*  
Sense Primer (5'-3'): GGT CTT GAG AGA TGG CTT GC  
Antisense Primer (5'-3'): TTG GCA AAG CCG TAG TTG
- DNA-Amplifikation
  - *Puffer, Applied Biosystems*
  - *Forward-Primer: Applied Biosystems, SEQuantFw, Sequenz:*  
ACG CGG AGC GGG AAA T
  - *Reverse-Primer: Applied Biosystems, SEQuantRev, Sequenz:*  
GGA CGA GGT AGC ACA GCT TCT C
  - *SEQuant Probe: Applied Biosystems, 5'-Fluor Labe, Sequenz:*  
6-FAM-CAT GCG TAA CAT CAA G-MGB

### Gel-Elektrophorese:

- Agarose - *PEQLAB: Universal Agarose*
- EDTA - *Roth, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>2H<sub>2</sub>O*
- TRIS - *Roth, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>*

## 2. Material

---

- Borsäure - *Roth, H<sub>3</sub>Bo<sub>3</sub>*
- HCl - *Merck: HCl*
- Ethidiumbromid - *Gibco*
- Ladepuffer - *Promega: Blue dextran loading solution*
- Allelic Ladder - *PEQLAB: 50bp DNA-Leiter, Konz. 0,5 mg/ml*

### Sterilisation:

- DEPC - *Sigma*

## 3. METHODEN

### 3.1. RNA-Isolation und -Quantifikation

#### 3.1.1. RNA-Isolation aus cerebralen Gewebeproben

Die RNA-Isolation erfolgte mittels eines RNA-Isolations-Systems (RNAagents®, Promega) nach der Methode von P. Chomczynski und N. Sacchi.

Von den bei -40 °C gelagerten Proben wurden jeweils ca. 100 mg reine Anteile der Rinde oder des Markes in noch gefrorenem Zustand entnommen und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben. Die nötige Menge an Denaturing Solution für cerebrale Proben entspricht nach vorliegender Anleitung 12 ml/g. Probe und Denaturing Solution werden nun in einen Glashomogenisator gegeben und so lange homogenisiert, bis mit dem bloßen Auge keine zusammenhängenden Gewebeteile mehr zu erkennen sind. Anschließend werden 800 µl des entstandenen Homogenisats in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, 0,1 Vol. % (hier: 80 µl) Natriumacetat und 1 Vol. % (hier: 800µl) Phenol-Chloroform zugegeben. Der gesamte Inhalt wird nun gut durchmischt, dann 15 min auf Eis gegeben und anschließend bei 4 °C und 10.000 g 20 min zentrifugiert. Durch die Senkung des pH-Wertes kommt es zur Phasentrennung: Die DNA lagert sich in der unteren Phase ab, die Proteine in der Interphase und die sauer gebliebene RNA in der oberen wässrigen Phase. Bis auf einen kleinen Rand wird die obere Phase nun in kleinen Schritten abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Dann erfolgt die Zugabe von Isopropanol in gleicher Menge. Nach ausführlichem Durchmischen und Inkubation der Proben für mindestens 30 min bei -18 °C kommt es zum Ausfällen der RNA. Die jetzt erfolgende erneute Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 g für 10 min lässt am Boden des Eppendorf-Gefäßes ein weißliches Pellet erscheinen. Der Überstand wird abgegossen und 1 ml 70 %iges Ethanol zugegeben, in dem das Pellet gewaschen wird. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation (4 °C, 10.000 g) wiederholt man diesen Schritt ebenso wie die Zentrifugation. Der Überstand wird erneut abgegossen. Daraufhin kommen die Proben für 15 min in einen Vakuumextraktor, in dem ihnen noch vorhandene Flüssigkeit entzogen wird.



Nach Zugabe von 50 µl nukleasefreiem Wasser werden die Proben für ca. 30 min in ein Wasserbad (60 °C) gesetzt. Um die Qualität der Proben zu gewährleisten, dürfen sie nun nicht mehr unnötig ungekühlt bleiben. Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden bei einer Temperatur von -18 °C aufbewahrt.

#### **3.1.2. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes**

Um bei späteren Versuchen gleiche RNA-Mengen einsetzen zu können, ist es von besonderer Bedeutung, die RNA-Konzentration einer jeden Probe zu kennen. Dies gelingt mit Hilfe des Photometers, das gleichzeitig auch eine Aussage über die Qualität der jeweiligen Probe macht. Hierfür wird jeweils 1 µl einer Probe mit 49 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und in eine sterile Küvette gegeben. Das Photometer misst die Extinktion A bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm. Eine Aussage über die RNA-Konzentration liefert die Extinktion bei 260 nm, da eine „Absorbance Unit“ bei dieser Wellenlänge 40 µg einzelsträngiger RNA pro ml entspricht. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \text{Extinktion A (260 nm)} \times \text{Konzentrationsfaktor} \times 40 \text{ }\mu\text{g/ml}$$

Der Konzentrationsfaktor entspricht bei unseren Bestimmungen  $k = 50$ , da die Proben mit einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurden.

Um etwaige Verunreinigungen auszuschließen betrachtet man den Quotienten Q der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260} / A_{280}$ ). Dieser sollte einen Wert von  $Q > 1,7$  und  $Q < 2,2$  liefern, wobei reine RNA einen Wert von  $Q = 2,0$  ergibt. Alle hier verwendeten Proben liegen im vorgegebenen Intervall.

#### **3.1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der Proben**

Durch Gelelektrophorese kann die Integrität der RNA überprüft und die Konzentrationsbestimmung validiert werden. Die verschieden großen RNA-Moleküle wandern hierbei in einem Träger (Agarose) mit verschiedenen Geschwindigkeiten durch ein elektrisches Feld, wodurch sich eine Auftrennung nach der Größe ergibt. Die kleinen Moleküle legen auf ihrem Weg von der

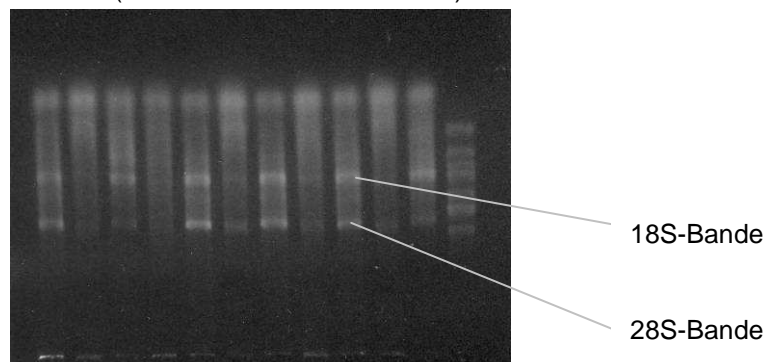
### 3. Methoden

---

Kathode zur Anode innerhalb einer bestimmten Laufzeit eine längere Strecke zurück als die größeren. Da die ribosomale RNA die weitaus größte RNA-Gruppe der Zelle darstellt werden die ribosomalen 28S- und 18S-Moleküle als Banden sichtbar.

Für die Herstellung des Gels muss zuerst ein Laufpuffer angesetzt werden, der sich aus 1 l Wasser, 108 g TRIS, 55 g Borsäure und 9,3 g EDTA zusammensetzt. Mit Hilfe von HCl wird er auf einen pH-Wert von 8,0 titriert. Zu 45 ml dieses Laufpuffers werden nun 450 mg Agarose gegeben und das Ganze in der Mikrowelle erhitzt, bis alles gelöst ist. Sobald das Gel auf 56 °C abgekühlt ist, werden 2 µl Ethidiumbromid zugegeben. Das Gel wird in eine zuvor abgedichtete Renner-Kammer gegeben und die dazugehörigen Kämme werden eingesetzt. Es dauert ca. 30 min bis die gewünschte Festigkeit erreicht ist. Daraufhin können die fertigen Gele in die Laufkammer gegeben werden, die dann bis zur Markierung mit Laufpuffer aufgefüllt wird. Die Kämme können unter Puffer gezogen werden, wodurch die charakteristischen Taschen entstehen, die nun befüllt werden können. Dafür werden Ladepuffer und Probe zu gleichen Teilen gemischt, wobei sich das nötige Probenvolumen durch die gewünschte RNA-Menge von 2000 ng ergibt. Bei jedem Gel wird eine Tasche mit einer 50 bp DNA-Allel-Leiter befüllt, die als Referenzgröße mitläuft. Nach Anlegen einer Spannung von  $U = 50 \text{ V}$  dauert es ca. 30 min bis die RNA entsprechend aufgetrennt ist. Abschließend wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

Abb. 10: Beispiel für ein Gel  
(Proben 45 - 55 + Allel-Leiter)



## **3.2. Reverse Transkription**

### **3.2.1. Von der RNA zur cDNA**

Für eine Quantifikation der Proben mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann nur DNA als Ausgangsmaterial verwendet werden und nicht RNA. Somit wird hier ein Zwischenschritt nötig, der die isolierte RNA in cDNA umschreibt. Dieser Vorgang wird als Reverse Transkription, das zugehörige Enzym als Reverse Transkriptase bezeichnet, welches als Substrat Nukleotidtriphosphate benötigt und den Original-Strang während der cDNA-Polymerisation abbaut. Jedem der erstellten Ansätze wurde eine künstliche RNA (RNA comp.) der Konzentration  $10^5$  Kopien /  $\mu\text{l}$  zugegeben, die in der PCR nur von speziellen Primern erkannt und sonst ignoriert wird. Vor der Zugabe muss sie mittels Wärmezufuhr aktiviert werden. Ebenso wird allen Proben ein RNase Inhibitor zugefügt um eventuell vorhandene RNAsen am RNA-Abbau zu hindern. Die jeder Probe zugegebene RNA Menge beträgt 500 ng. Das entsprechende Volumen kann mit Hilfe der photometrischen Konzentrationsbestimmung und der Formel  $c = M / V$  berechnet werden. Da bei dieser Untersuchung die mRNA von besonderem Interesse ist und da die Polymerase nicht selbständig an den RNA-Strängen ansetzen kann, sind Primer nötig, die dies erlauben bzw. begünstigen. Die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten und miteinander verglichenen Primer sollen hier kurz vorgestellt werden.

#### 3.2.1.1. Oligo-(dT)-Primer

Oligo-(dT)-Primer sind kurze DNA-Einzelstränge, die ausschließlich Thymin als Base tragen. Sie binden daher an den Poly-A-Schwanz, den ausschließlich mRNAs besitzen und ermöglichen der Reversen Transkriptase die Polymerisation in 5'-3'-Richtung.

Abb. 11: Oligo-(dT)-Primer



### 3. Methoden

---

Für die Transkription mit Oligo-(dT)-Primern wurde nach folgendem Schema vorgegangen, welches ein Volumen von 30 µl ergibt:

- 6,0 µl Puffer
- 3,0 µl NTP
- 1,5 µl Oligo-(dT)-Primer
- 1,5 µl RTase
- 0,9 µl RNase Inhibitor
- 3,0 µl RNA comp.
- 14,1 µl Wasser und Proben-RNA in berechnetem Verhältnis (s.o.)

#### 3.2.1.2. Anker-Primer

Anker-Primer bestehen wie die Oligo-(dT)-Primer aus einer Poly-T-Sequenz, jedoch besitzen sie jeweils ein zusätzliches Nukleotid, Guanin, Cytosin oder Adenin, am 5'-Ende dieser T-Sequenz. Somit binden diese Primer immer am Ende des Poly-A-Cap und nicht beliebig in diesem Bereich wie die Oligo-(dT)-Primer. Es wird also durch diese Primer-Art gewährleistet, dass nur die relevante mRNA-Sequenz und nicht immer jeweils unterschiedliche Anteile des Poly-A-Cap mit-transkribiert werden.

Abb. 12: Anker-Primer



Für diese Transkription wurde nach folgenden Vorgaben vorgegangen:

- 6,0 µl Puffer
- 3,0 µl NTP
- 1,5 µl Anker-Primer
- 1,5 µl RTase
- 0,9 µl RNase Inhibitor
- 3,0 µl RNA comp.
- 14,1 µl Wasser und Proben-RNA in berechnetem Verhältnis (s.o.)

#### 3.2.1.3. Random-Primer

Random-Primer, genauer Random-Hexamer-Primer sind 6 Basenpaare lange Nukleotidsequenzen, die in allen möglichen Kombinationen der 4 verschiedenen Basen vorliegen. Sie binden willkürlich an verschiedene Stellen der gesamten isolierten RNA und transkribieren so alle Fragmente unabhängig vom Poly-A-Cap.

Abb. 13: Random-Primer



Die RNA, die mit Random-Primern revers transkribiert wurde, erhielt folgende Menge der oben genannten Reagenzien:

- 6,0 µl Puffer
- 3,0 µl NTP
- 1,2 µl Random Primer
- 1,5 µl RTase
- 0,9 µl RNase Inhibitor
- 3,0 µl RNA comp.
- 14,4 µl Wasser und Proben-RNA in berechnetem Verhältnis (s.o.)

#### 3.2.2. Reverse Transkription unter Verwendung einer DNase

Einige Proben wurden erneut unter der Verwendung einer DNase revers transkribiert, um später eine vergleichende Aussage machen zu können. Befinden sich in den Proben trotz aller bei der Isolation getroffenen Maßnahmen DNA-Reste, so könnten diese die spätere PCR verfälschen. Die Zugabe einer DNase würde diesen Störfaktor dann im Zuge der reversen Transkription eliminieren.

Bei den ausgewählten Proben wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

- 2,0 µl Puffer
- 1,0 µl NTP
- 0,5 µl Oligo-(dT)-Primer

- 0,3 µl RNase Inhibitor
- 1,0 µl RNA comp.
- 0,5 µl DNase
- 4,2 µl Wasser und Proben-RNA in berechnetem Verhältnis (s.o.)

Die noch fehlenden 0,5 µl RTase werden erst nach der Aktivierung und Reaktion der DNase zugegeben, um ein Anlagern der Primer an DNA-Stücke zu verhindern.

#### **3.2.3. Durchführung der Reversen Transkription**

Die vorbereiteten Proben werden nach Zugabe der oben genannten Reagenzien direkt in den Thermocycler gegeben. Das entsprechende Programm erhitzt die Proben für 1 h auf 85 °C, das die vorgegebene Temperatur für das optimale Arbeiten der Reversen Transkriptase darstellt; danach werden sie auf 4 °C abgekühlt.

Alle Proben wurden im Anschluss daran bis zur weiteren Verarbeitung (PCR) bei -18 °C gelagert.

### **3.3. Amplifikation der cDNA**

#### **3.3.1. Die Polymerasekettenreaktion**

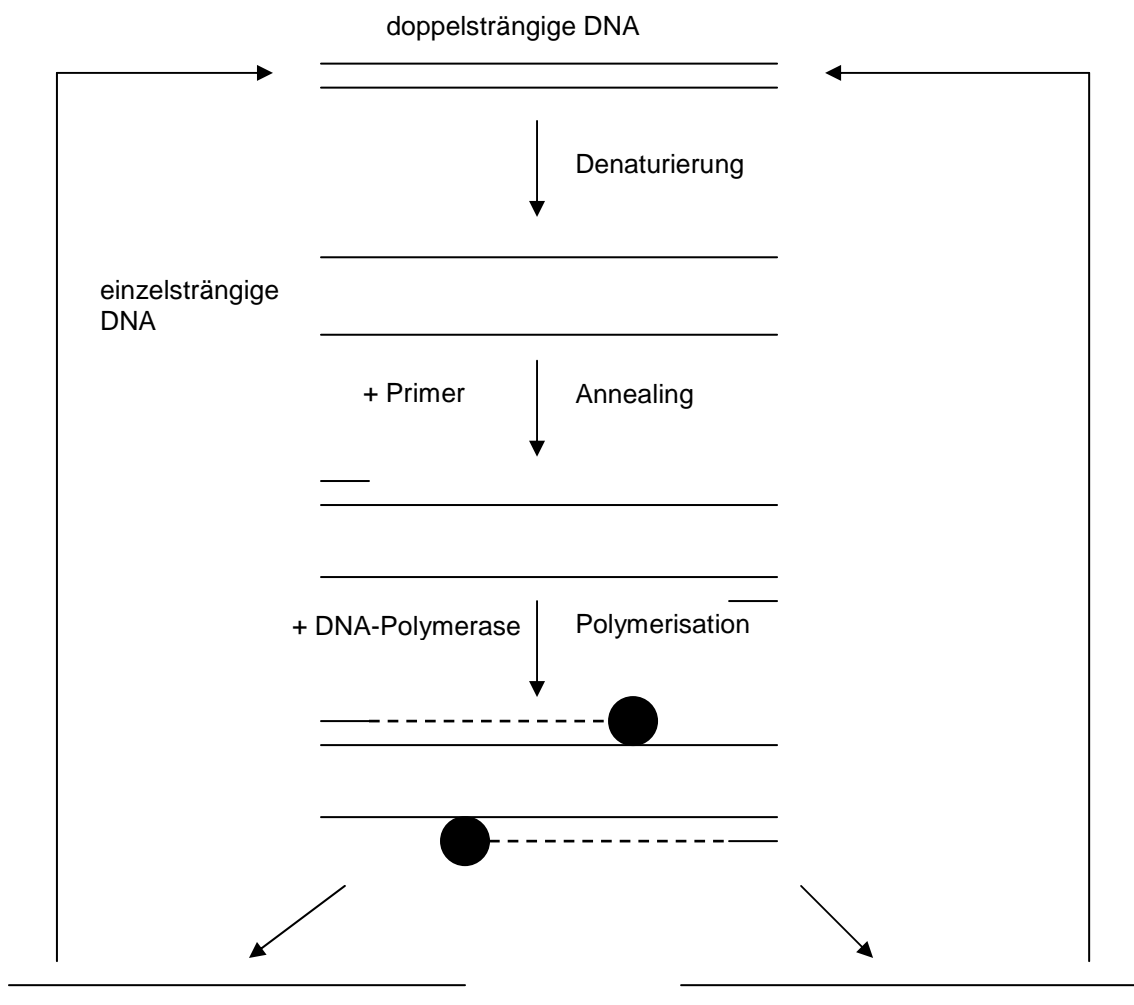
Die Aufgabe der PCR (Polymerasekettenreaktion) ist es, einen bestimmten DNA-Abschnitt des Genoms zu vervielfältigen. Vorbild dieser Methode ist die DNA-Replikation der Zelle. Zu einem Ansatz werden 2 DNA-Primer gegeben, die das zu amplifizierende Stück flankieren, ebenso wie eine DNA-Polymerase und die zugehörigen Nukleotide. Durch Erhitzen auf mindestens 90 °C wird die doppelsträngige DNA zuerst denaturiert, so dass DNA-Einzelstränge entstehen. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C können die Primer an die entsprechenden Stellen der DNA binden, was als Annealing bezeichnet wird. Die DNA-Polymerase, die heute verwendet wird, wurde aus einem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*), das in einem Geysir im Yellowstone Nationalpark bei 70 - 75 °C lebt, isoliert. Daher muss die Temperatur für die Polymerisation wiederum erhöht werden. Im Gegensatz zu einer Polymerisation mit einer Polymerase, die

### 3. Methoden

---

bei 37 °C arbeitet, muss diese nun nicht mehr bei jedem Reaktionszyklus neu zugegeben werden, da sie bei über 90 °C zerstört werden würde und viele Fehlhybridisierungen können vermieden werden. Danach werden die durchgeführten Schritte wiederholt, was zu einer exponentiellen Amplifikation des entsprechenden DNA-Stückes führt.

Abb. 14: Polymerasekettenreaktion  
aus 12



Die einzelnen Schritte konnten mit Hilfe von Thermocyclern automatisiert werden.

Durch ihre besonders hohe Sensitivität findet die PCR Anwendung in den verschiedensten Bereichen wie Grundlagenforschung, Humangenetik,

diagnostische und forensische Analysen, Züchtungsforschung oder Artenschutz.

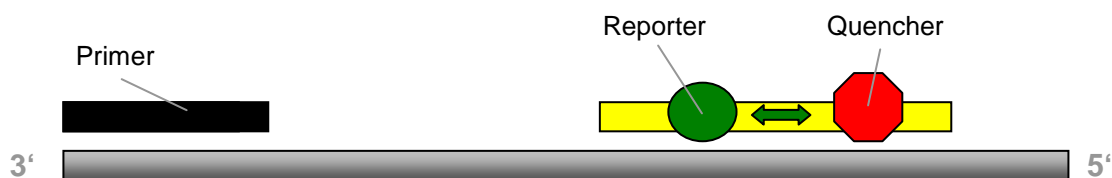
#### 3.3.2. Realtime-PCR

Die Realtime-PCR, die in dieser Arbeit ausschließlich angewandt wurde, erlaubt im Vergleich zur „normalen“ PCR eine vergleichende oder absolute Bestimmung der Menge an Ausgangs-DNA. Während des Ablaufs der Polymerasekettenreaktion kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenz, die von Realtime-PCR-Detektionssystemen erkannt und aufgezeichnet wird. Mittlerweile gibt es verschiedene derartige Systeme, die nach diesem Prinzip arbeiten.

##### 3.3.2.1. TaqMan-Sonden

Eine, in dieser Arbeit angewandte Möglichkeit, ist die Verwendung von Fluoreszenz-markierten DNA-Hybridisierungssonden (TaqMan-Sonden), die an eine komplementäre Region der einsträngigen Ziel-DNA binden. Die Sonde besitzt an den jeweiligen Enden der komplementären Nukleinsäuresequenz einen bzw. zwei Fluoreszenzfarbstoffe, Reporter- und Quencher-Molekül genannt, die sich solange sie benachbart liegen in ihrer Aktivität hemmen, so dass keine Fluoreszenz frei wird.

Abb. 14: Fluoreszenz-markierte DNA-Hybridisierungssonde I  
modifiziert nach 37



Beginnt nun die DNA-Polymerase mit der Neustrangsynthese, so entfaltet sie beim Erreichen der Sonde ihre 5'-3' Exonukleaseaktivität, wodurch sowohl Reporter als auch Quencher getrennt voneinander entlassen werden. Ohne den

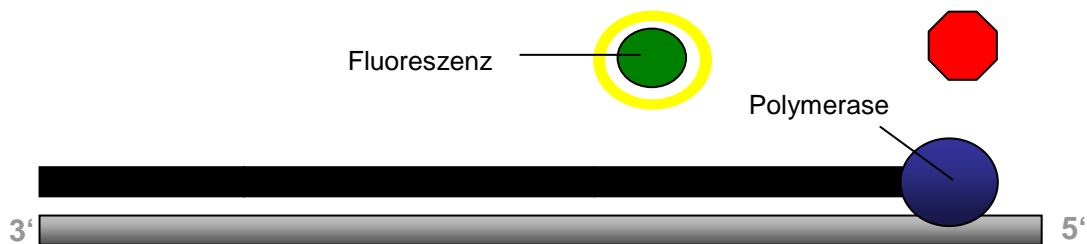


### 3. Methoden

---

hemmenden Einfluss des Quencher-Moleküls kann die Fluoreszenz des Reporters nun detektiert werden.

Abb. 15: Fluoreszenz-markierte DNA-Hybridisierungssonde II  
modifiziert nach 37



Im Idealfall erfolgt so pro Amplifikationszyklus eine Verdoppelung der Fluoreszenz.

#### 3.3.2.2. SYBR-Green I

Bei SYBR-Green I handelt es sich um einen Fluoreszenz-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und der mit dem Eingehen dieser Bindung zu leuchten beginnt. Da beim Abkühlvorgang jedes Zyklus wieder doppelsträngige DNA entsteht kommt es auch hier zu einem exponentiellen Fluoreszenz-Anstieg. Es handelt sich hier nicht um eine Sonde, die komplementär zu einer Ziel-DNA ist, sondern um ein Fluorophor, weshalb die Aneinanderheftung von Farbstoff und Doppelstrang-DNA unspezifisch stattfindet. Primer-Dimere, die sich eventuell bilden und die so ebenfalls ein Fluoreszenz-Signal aussenden könnten, haben allesamt einen niedrigeren Schmelzpunkt und können so von den gewünschten Amplifikationsprodukten unterschieden werden.

#### 3.3.2.3. Die Realtime-PCR-Fluoreszenz-Kurve

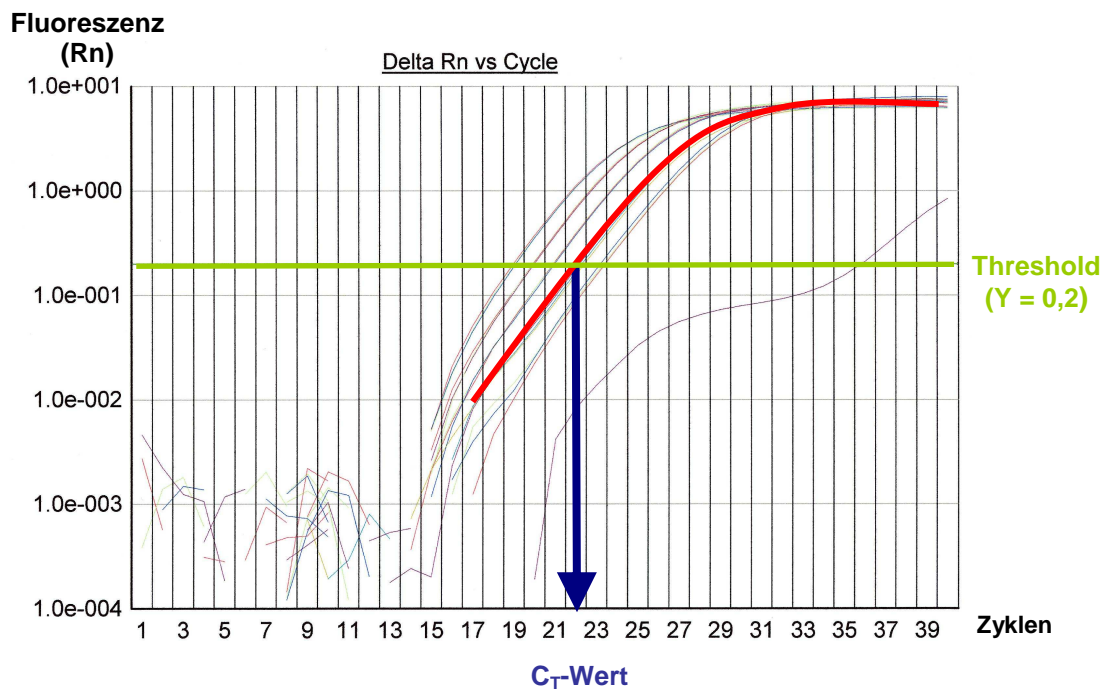
Nach abgelaufener Polymerasekettenreaktion zeichnet das Realtime-PCR-Gerät eine Fluoreszenz-Kurve, die den Amplifikationsverlauf zeigt. Auf der X-Achse ist die Anzahl der durchlaufenen Zyklen aufgetragen, auf der Y-Achse die jeweils gemessene Fluoreszenz. Der  $C_T$ -Wert (Cycle of threshold), der den Ergebniswert bildet, ergibt sich durch den X-Achsenwert am Schnittpunkt der

### 3. Methoden

---

Kurve mit dem sogenannten Threshold, stellt also mit anderen Worten den PCR-Zyklus dar, an dem die Fluoreszenz der entsprechenden Probe den definierten Schwellenwert überschreitet. Diese Gerade kann willkürlich festgelegt oder vom Gerät bestimmt werden. Sie muss jedoch die Kurve im ansteigenden Teil schneiden, um im exponentiellen Amplifikationsverlauf zu liegen, denn nur hier ist gewährleistet, dass tatsächlich bei idealer Effizienz eine Verdopplung der amplifizierten DNA pro Zyklus stattfindet. In dieser Arbeit entspricht der Threshold der Geraden  $y = 0,2$ .

Abb. 16: Amplifikationsverlauf  
modifiziert nach 1



#### 3.3.2.4. Durchführung der Realtime-PCR

Alle durch reverse Transkription gewonnenen Proben wurden mit Hilfe des Realtime-PCR-Gerätes „ABI Prism 7000 Sequence Detection System“ amplifiziert, bei welchem die parallele Bearbeitung von jeweils 96 Proben möglich ist. Um in dieser Studie eine präzise Quantifizierung zu gewährleisten und Pipettierfehler oder Laufvariationen zu erkennen und auszugleichen, wurden immer mindestens 3 Aliquots von einer Ausgangs-cDNA amplifiziert.

### 3. Methoden

---

Nach einem Intervall der Aktivierung von 15 min bei 95 °C erfolgt der Übergang in die repetitiven Zyklen, die wie bereits prinzipiell erläutert immer aus einem Abschnitt von 15 Sekunden bei 95 °C und einem einminütigen bei 60 °C bestehen. Um das Intervall des exponentiellen Verlaufs bei allen Proben zu erhalten, wurde eine Zyklusanzahl von  $n = 40$  ausgewählt.

Die einzelnen Realtime-PCR-Ansätze enthalten insgesamt 20  $\mu\text{l}$  und sind für die verwendeten Haushalts-Gene wie nun folgend zusammengesetzt:

Cyclophilin:

- 10  $\mu\text{l}$  Absolute SYBR Green ROX Mix
- 1,6  $\mu\text{l}$  Cyclophilin-Primer (wild Typ bzw. comp. Typ)
- 7,4  $\mu\text{l}$  Nuklease-freies Wasser
- 1,0  $\mu\text{l}$  revers transkribierte Probe

GAPDH / ACTB:

- 10  $\mu\text{l}$  Absolute SYBR Green ROX Mix
- 1,0  $\mu\text{l}$  GAPDH- / ACTB - Primer Pair
- 8,0  $\mu\text{l}$  Nuklease freies Wasser
- 1,0  $\mu\text{l}$  revers transkribierte Probe

GAPDH2 / FASN1 / FASN4:

- 10  $\mu\text{l}$  Absolute SYBR Green ROX Mix
- 0,4  $\mu\text{l}$  GAPDH2- / FASN1- / FASN4- Primer Pair
- 8,6  $\mu\text{l}$  Nuklease freies Wasser
- 1,0  $\mu\text{l}$  revers transkribierte Probe

Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen, bei der reversen Transkription verwendeten Primern zu erhalten, wurde jedes Haushalts-Gen mit unterschiedlichen revers transkribierten Proben amplifiziert. Insgesamt wurden folgende Versuche durchgeführt, wobei eine Amplifikation aufgrund des ähnlichen Aufbaus immer nur mit Anker- oder mit Oligo-dT-Primern erfolgte:

### 3. Methoden

---

	<b>Oligo-dT-Primer</b>	<b>Anker-Primer</b>	<b>Random-Primer</b>
<b>Cyclophilin</b>	<b>X</b>		<b>X</b>
<b>GAPDH</b>		<b>X</b>	<b>X</b>
<b>ACTB</b>		<b>X</b>	<b>X</b>
<b>GAPDH2</b>		<b>X</b>	<b>X</b>
<b>FASN1</b>		<b>X</b>	<b>X</b>
<b>FASN4</b>		<b>X</b>	<b>X</b>

#### 3.3.2.5. Realtime-PCR: DNA-Nachweis

Um erneut zu gewährleisten, dass sich auch in den revers transkribierten Proben keine DNA befindet, die die Ergebnisse möglicherweise verfälschen könnte, wurden alle Proben erneut untersucht. Mit Hilfe von Primern, die an spezielle nicht-codierende DNA Abschnitte binden erfolgte ein Amplifikationsversuch mittels Realtime-PCR nach bereits beschriebenem Schema.

DNA-Amplifikationsansatz:

- 10 µl Puffer
- 1,8 µl Forward-Primer
- 1,8 µl Reverse-Primer
- 0,4 µl SEQuant Probe
- 5,0 µl Nuklease freies Wasser
- 1,0 µl revers transkribierte Probe

Ein gescheiterter Amplifikationsversuch bzw. ein später und damit unspezifischer Anstieg der Fluoreszenz würde das Fehlen von DNA bestätigen.

#### **3.4. Standardkurven**

Da in dieser Arbeit mit Hilfe der Realtime-PCR eine quantitative Aussage über den RNA-Gehalt der einzelnen Proben angestrebt wird, ist es von entscheidender Bedeutung zu zeigen, dass durch die verschiedenen Arbeitsschritte, sowohl der reversen Transkription als auch der Realtime-PCR, die Zusammensetzung und der RNA-Gehalt nicht verändert wird. Aus diesem Grund wurden Standardkurven erstellt, die das Verhalten einer Konzentrationsreihe im Verlauf der genannten Vorgehensweisen zeigen.

Als Ausgangssubstrat wurde eine RNA aus menschlichem Gehirn mit bekannter Konzentration ausgewählt (Ambion<sup>®</sup> Human Brain RNA, 1000 ng/μl). Durch den Einsatz unterschiedlicher Volumina wurden Proben mit unterschiedlichem RNA-Gehalt hergestellt. Um die einzelnen Arbeitsschritte auch getrennt beurteilen zu können wurde zum einen die RNA selbst verdünnt und zum anderen die zuvor durch reverse Transkription synthetisierte cDNA.

##### **3.4.1. Verdünnung der RNA**

Es wurden hierbei verschiedene Proben erstellt, die entweder 1000 ng, 750 ng, 500 ng oder 250 ng der Ambion<sup>®</sup> Human Brain RNA enthielten. Die reverse Transkription erfolgte mit den verschiedenen bereits vorgestellten Primern nach den nun folgenden Schemata.

###### **3.4.1.1. Reverse Transkription mit Oligo-(dT)-Primern**

Ansatz für ein Endvolumen von 10 μl:

- 2,0 μl Puffer
- 1,0 μl NTP
- 0,5 μl Oligo-(dT)-Primer
- 0,5 μl RTase
- 0,3 μl RNase Inhibitor
- 1,0 μl RNA comp.

### 3. Methoden

---

Von der Ambion<sup>®</sup> Human Brain RNA wurden entsprechend 1 µl, 0,75 µl, 0,5 µl oder 0,25 µl zugegeben, das Restvolumen zum Endvolumen von 10 µl wurde mit Nuklease freiem Wasser aufgefüllt.

#### 3.4.1.2. Reverse Transkription mit Anker-Primern

Ansatz für ein Endvolumen von 10 µl:

- 2,0 µl Puffer
- 1,0 µl NTP
- 0,5 µl Anker-Primer
- 0,5 µl RTase
- 0,3 µl RNase Inhibitor
- 1,0 µl RNA comp.

Von der Ambion<sup>®</sup> Human Brain RNA wurden entsprechend 1 µl, 0,75 µl, 0,5 µl oder 0,25 µl zugegeben, das Restvolumen zum Endvolumen von 10 µl wurde mit Nuklease freiem Wasser aufgefüllt.

#### 3.4.1.3. Reverse Transkription mit Random-Primern

Ansatz für ein Endvolumen von 10 µl:

- 2,0 µl Puffer
- 1,0 µl NTP
- 0,4 µl Random-Primer
- 0,5 µl RTase
- 0,3 µl RNase Inhibitor
- 1,0 µl RNA comp.

Von der Ambion<sup>®</sup> Human Brain RNA wurden entsprechend 1 µl, 0,75 µl, 0,5 µl oder 0,25 µl zugegeben, das Restvolumen zum Endvolumen von 10 µl wurde mit Nuklease freiem Wasser aufgefüllt.

Von allen cDNA-Proben wurden bei der Realtime-PCR 3 Aliquots erstellt, wobei hier die Primer für die Haushaltsgene GAPDH und ACTB verwendet wurden.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze entspricht der weiter oben bereits genannten.

#### **3.4.2. Verdünnung der cDNA**

Um eine cDNA-Kopie der Ambion<sup>®</sup> Human Brain RNA zu erhalten wurde diese zuerst unter Verwendung von Random Primern revers transkribiert. Wie bei den eigentlichen RNA-Proben wurden auch hier 500 ng als Ausgangsmenge eingesetzt.

Ansatz für die reverse Transkription:

- 2,0 µl Puffer
- 1,0 µl NTP
- 0,4 µl Random-Primer
- 0,5 µl RTase
- 0,3 µl RNase Inhibitor
- 1,0 µl RNA comp.
- 0,5 µl Ambion<sup>®</sup> Human Brain RNA
- 4,3 µl Wasser

Nach erfolgter reverser Transkription wird die Hälfte cDNA Probe zu gleichem Anteil mit Wasser verdünnt. Von dieser wird nun wiederum die Hälfte entnommen und erneut die gleiche Menge Wasser hinzugefügt, usw. Die erhaltenen cDNA Verdünnungen entsprechen 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng und 31,25 ng.

Von allen cDNA-Proben wurden bei der Realtime-PCR ebenfalls 3 Aliquots hergestellt, wobei gleichermaßen Primer der Haushaltsgene GAPDH und ACTB verwendet wurden. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze entspricht der weiter oben bereits genannten.

#### **3.5. Auswertung**

Die unter 3.5.1. und 3.5.2. verwendeten Formeln richten sich nach den PCR-Auswertungsverfahren von Livak et al 2001 und Pfaffl et al 2004.

##### **3.5.1. Die Berechnung der Realtime-PCR-Effizienz**

Die Effizienz (latein: efficere „bewirken“) beschreibt die PCR bezüglich der Erzielung der erwarteten Wirkung, welche in diesem Fall eine Verdoppelung der DNA-Menge mit jedem Reaktionszyklus ist. Eine Effizienz von  $E = 2$  stellt somit einen idealen Reaktionsablauf dar. Die Berechnung dieses Wertes erfolgt mit Hilfe der Steigung der erstellten Standardkurven:

$$E = 10^{(-1 / \text{Steigung})}$$

Da sich alle berechneten Effizienzen (siehe 4.2.2.) in einem relativ kleinen Intervall aufhalten und einen Mittelwert  $E_M = 1,9$  bilden, wurde für alle weiteren Berechnungen und Auswertungen eine ideale Effizienz von  $E = 2 = 100\%$  angenommen.

##### **3.5.2. Relative Quantifizierung mit der $\Delta C_T$ -Methode**

Eine exponentielle Amplifikation die von einem bestimmten Anfangsgehalt an DNA ausgeht wird durch die Gleichung

$$X = X_0 \times E^n$$

beschrieben, wobei  $X$  für die Anzahl der Kopien nach einer bestimmten Zykluszahl  $n$  steht,  $X_0$  für die initiale DNA-Molekülmenge und  $E$  für die oben beschriebene Effizienz. Da in dieser Arbeit nicht die Anzahl der durchlaufenen Zyklen konstant ist, sondern die gemessene Fluoreszenz, welche durch den unterschiedlichen Anfangsgehalt an RNA bzw. cDNA zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht wird, steht die Zyklusanzahl für den jeweils gemessenen  $C_T$ -Wert.



$$X = X_0 \times E^{CT}$$

Um eventuelle Laufvariationen ausgleichen zu können wurden alle Proben zu einer jeweils mitgelaufenen Standard RNA (Ambion: Human Brain Total RNA, 500 ng) von der ebenfalls je 3 Aliquots erstellt wurden in Bezug gesetzt. Die Amplifikationsgleichung für eine bestimmte Probe p lautet somit

$$X_p = X_0 \times E^{CT_p}$$

die für den mitgelaufenen Standard-Wert

$$X_s = X_0 \times E^{CT_s}$$

Werden nun beide Gleichungen durch Division zu einer zusammengefasst ergibt sich die Ratio R, die in dieser Arbeit den Ergebniswert bildet:

$$R = \frac{X_p}{X_s} = \frac{X_0 \times E^{CT_p}}{X_0 \times E^{CT_s}}$$

Durch mathematisches Umformen ergibt sich die endgültige Formel für die Berechnung der Ratio R:

$$R = E^{-\Delta CT}$$

#### 3.5.3. Ausreißerelimination

Um eine einheitliche Differenzierung zwischen Ausreißerwerten und verwendbaren Werten der 3 jeweils erstellten Aliquots durchführen zu können, wurden feste Regeln aufgestellt nach denen bei allen Ergebnissen der Realtime-PCR die Elimination erfolgte. Die folgenden Angaben beziehen sich demnach auf alle erhaltenen  $C_T$ -Werte.

- Liegt ein  $C_T$ -Wert außerhalb eines Intervalls der Größe 0,3, in dem sich die anderen beiden Werte befinden, so wird dieser eliminiert.

### 3. Methoden

---

- Ist kein Intervall von 0,3 festlegbar in dem mindestens 2  $C_T$ -Werte liegen, bleiben alle Werte erhalten.
- Wird vom Realtime-PCR-Gerät ein bzw. zwei  $C_T$ -Werte als „Undetermined“ angegeben, so bleiben die anderen beiden bzw. der einzelne  $C_T$ -Wert erhalten.
- Sind zwei Intervalle mit jeweils zwei  $C_T$ -Werten möglich, so bleiben die beiden  $C_T$ -Werte mit der geringeren Differenz erhalten. Ist die Differenz identisch, so bleiben alle 3  $C_T$ -Werte erhalten.
- Liegen alle  $C_T$ -Werte in einem Intervall von 0,3, so bleiben alle 3 erhalten.

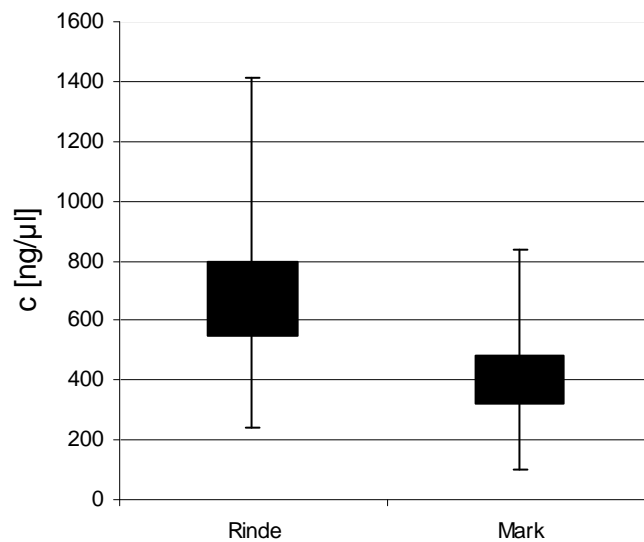
## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. RNA- bzw. DNA-Gehalt der Proben

#### 4.1.1. Vergleich des photometrisch bestimmten RNA-Gehalts

Der Arbeitsschritt der RNA-Isolation wurde mit Proben aus reinen Rinden- sowie aus reinen Mark-Anteilen durchgeführt. In der anschließend durchgeführten photometrischen Konzentrationsbestimmung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Probeentnahmestellen.

Abb. 16: RNA-Konzentration in Rinden-/Mark-Proben



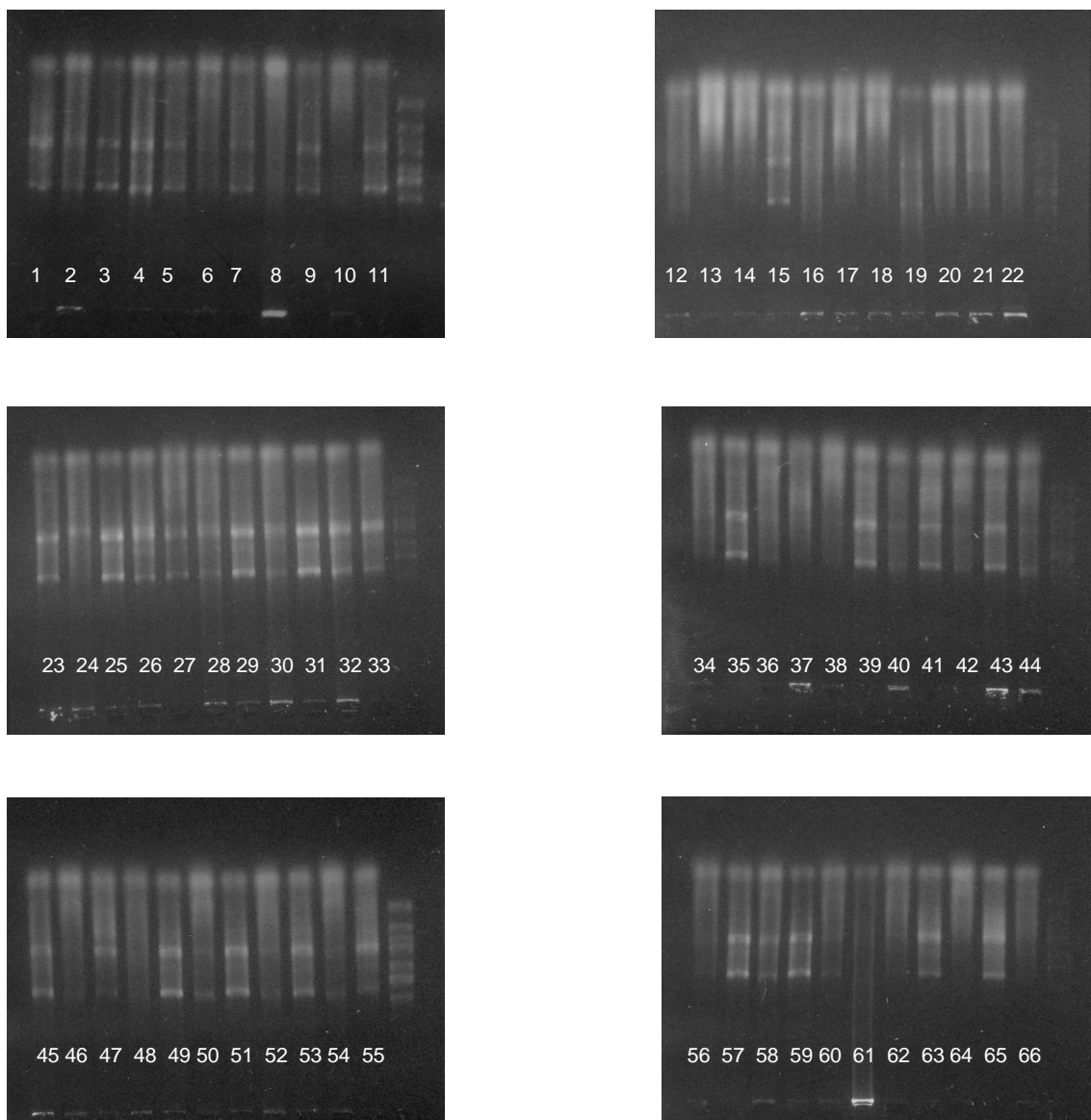
Die schwarz markierten Bereiche der Abbildung beinhalten alle Werte zwischen dem 25. und dem 75. Quartil, während die Anker die Maximal- bzw. die Minimalwerte anzeigen. Bei den Proben aus der Rinden-Region liegen 50 % der Werte zwischen 549,3 ng/µl und 795,5 ng/µl, bei denen aus Mark-Bereichen zwischen 318,7 ng/µl und 479,2 ng/µl. Die Differenz der Konzentrations-Mittelwerte beträgt 302,1 ng/µl zugunsten der Rinden-Proben.

Da die Hirn-Rinde trotz unterschiedlicher Leichenliegezeiten generell einen höheren RNA-Gehalt aufweist und die Mark Proben im Mittel nur 63,2 % dieser Konzentrationen erreichen, wurden alle weiteren Versuche mit dem RNA-Material aus cerebraler Rinde durchgeführt.

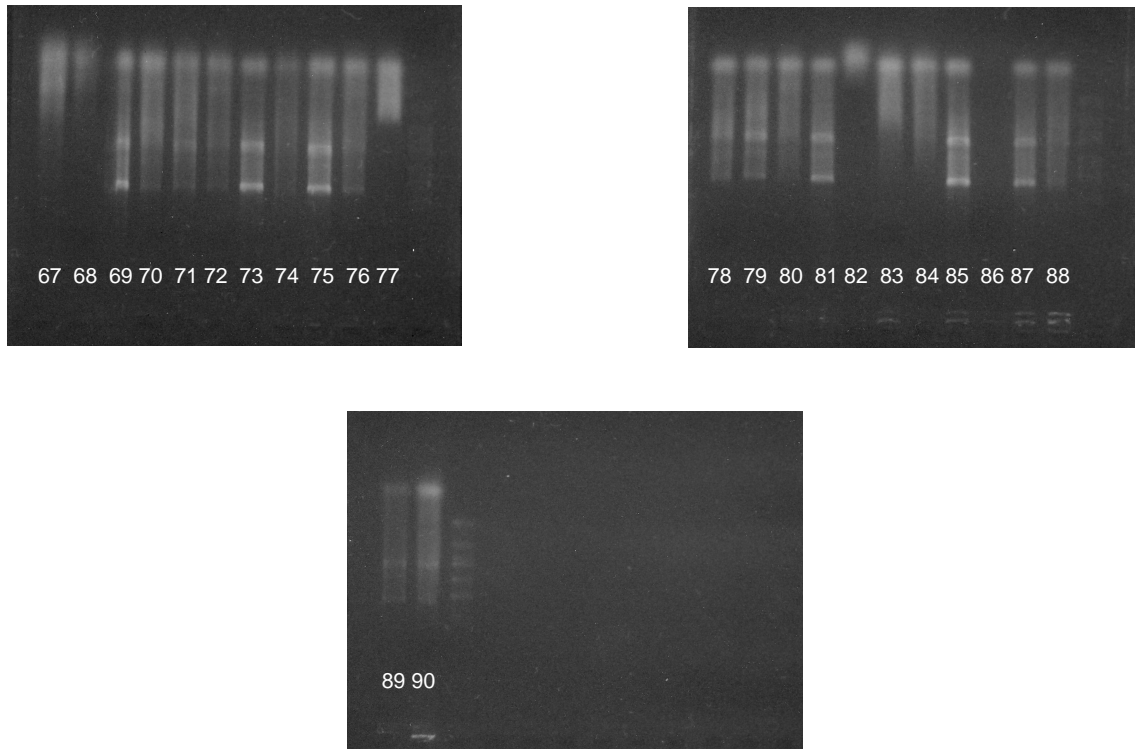
### 4.1.2. Gelelektrophoretische Darstellung der typischen RNA-Banden

Ein erster Nachweis, dass es sich bei dem isolierten Material tatsächlich um RNA handelt wurde durch die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erbracht. Bei den erwarteten Banden handelt es sich um die ribosomalen 28S- und 18S-Moleküle. Jedes Gel enthält zum Vergleich eine DNA-Allel-Leiter.

Abb. 17: Gelelektrophoretische Auftrennung der Proben

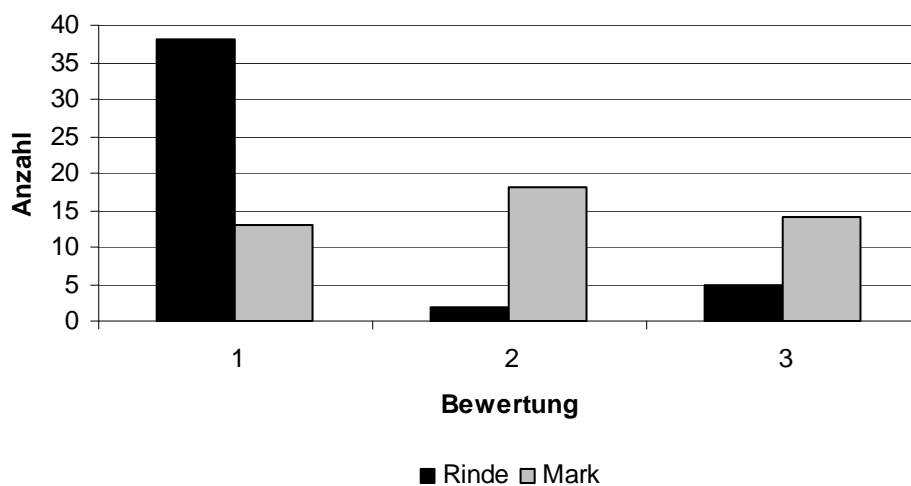


## 4. Ergebnisse



Alle Banden wurden mit Hilfe einer visuellen Analogskala bewertet und als Zahlenwerte wiedergegeben. Die entsprechende Zuordnung ergibt sich aus der Sichtbarkeit und Erkennbarkeit der beiden ribosomalen Banden. Der Zahlenwert 1 bezeichnet eine deutliche Abgrenz- und Erkennbarkeit, 2 steht für ein mäßiges Ergebnis und 3 steht für keine erkennbaren Fluoreszenzbanden.

Abb. 18: Bewertung der gelelektrophoretischen Auftrennung

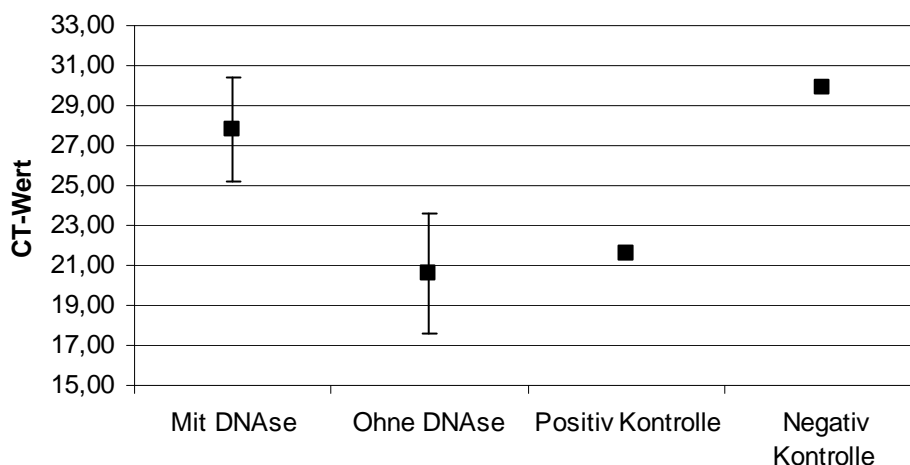


Auch hier zeigt sich eine bessere Qualität der isolierten Rinden-Anteile, die zu 84,4 % eine ideale Sichtbarkeit der beiden Banden aufweisen, während dies bei Proben aus der Mark-Region nur zu 28,9 % der Fall ist.

### 4.1.3. Die Verwendung einer DNase

Im Zuge der Reversen Transkription wurde ein Teil der Proben mit bzw. ohne DNase in cDNA transkribiert und anschließend unter Verwendung des Housekeeping Genes Cyclophilin amplifiziert.

Abb. 19: Vergleich von Reaktionen mit und ohne DNase



Das Schaubild zeigt unter Verwendung der DNase ein viel späteres Überschreiten des Grenzwertes (Threshold) als ohne. Da sich dieser Wert bereits der Negativkontrolle annähert ist eine eventuell zusätzliche RNA-Verdauung in Betracht zu ziehen. Daher wurde in allen durchgeführten reversen Transkriptionen auf die Verwendung einer DNase verzichtet.

### 4.1.4. DNA-Gehalt der Proben

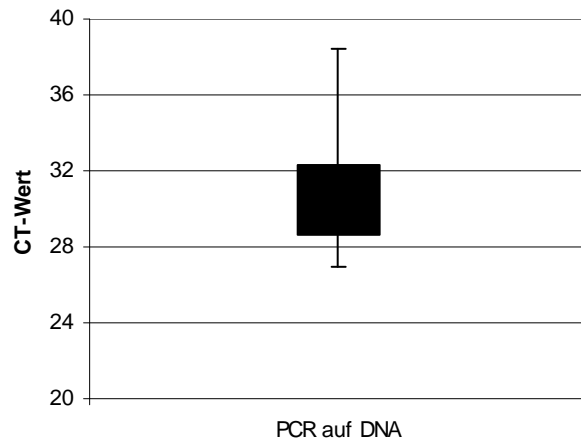
Die Überprüfung des Probeninhaltes auf DNA mittels einer PCR, deren Primer an spezielle nicht-codierende DNA-Abschnitte binden, ergab einen mittleren  $C_T$ -Wert von 29,71. Der Maximalwert lag bei 38,38, der Minimalwert bei 26,98, womit die Gesamtheit aller  $C_T$ -Werte im Bereich der Negativkontrolle liegt, da

## 4. Ergebnisse

---

ein derart später Fluoreszenzanstieg auf keine adäquate Amplifikation schließen lässt.

Abb. 20: Realtime-PCR zum Nachweis evtl. vorhandener DNA



Das Schaubild zeigt einen schwarzen Balken dessen Begrenzung das 25. bzw. 75. Quartil darstellt. Die beiden Anker markieren den Minimal- bzw. Maximalwert.

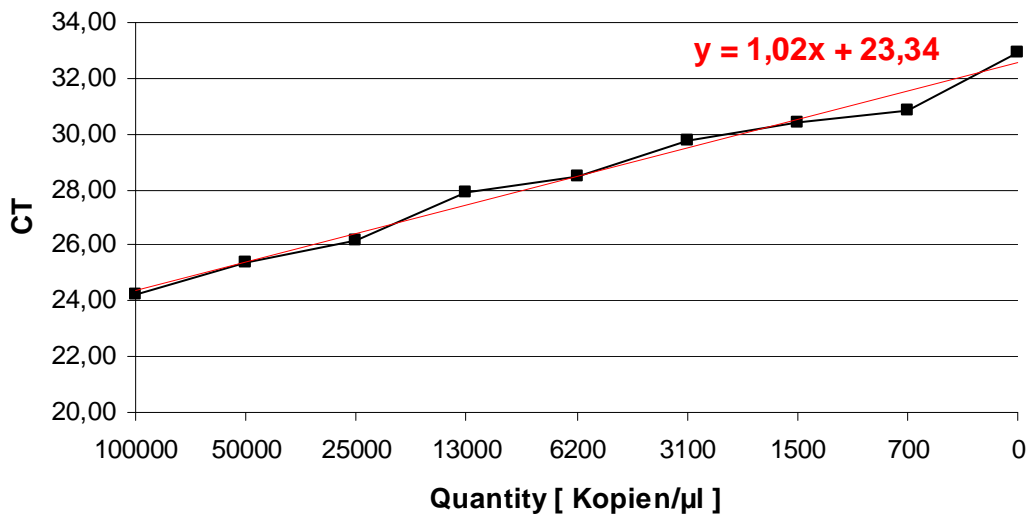
### 4.2. Validierung der RT-PCR- Methodik

#### **4.2.1. Konzentrationsvergleich mit RNA comp. Verdünnungsreihen**

Zur Validierung der Methode bzw. zum Beweis, dass durch die angewandten Verfahren der RNA- und cDNA-Gehalt der Proben nicht verändert wird, wurden mit Hilfe der RNA comp. Verdünnungsreihen hergestellt, diese mit den zugehörigen Primern revers transkribiert und mit dem Haushalts-Gen Cyclophilin amplifiziert. Im Idealfall würde der Threshold bei halbiertes Ausgangskonzentration ein Amplifikationszyklus später überschritten, was bei Fortsetzung zu einer Ausgleichsgerade der Steigung 1 führen müsste.

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs bei Auftragung der  $C_T$ -Werte gegen die Konzentration der Ausgangsproben. Die erstellte Ausgleichsgerade besitzt eine Steigung von  $m = 1,02$ , was die Anwendbarkeit des Verfahrens bestätigt.

Abb. 21: Konzentrationsvergleich mit RNA-comp-Verdünnungsreihe



### 4.2.2. Die PCR-Effizienz

Um die tatsächliche PCR-Effizienz angeben zu können, wurden die Ergebnisse der erstellten Standardkurven in logarithmischen Koordinatensystemen dargestellt. Bei Annahme einer idealen Effizienz von  $E = 2$  ergibt sich folgende Gleichung:

$$2 = 10^{(-1/m)}$$

Durch Umformung und Auflösung nach der Steigung  $m$  ergibt sich:

$$m = -3,32$$

Der angestrebte Wert für die Steigung  $m$  der Standardkurven entspricht demnach  $-3,32$ .

Für eine Effizienz-Berechnung, die sich möglichst nahe an den weiteren Versuchen orientiert, wurden Standardkurven sowohl mit den verschiedenen Primern, als auch mit den verschiedenen Haushalts-Genen erstellt.

In erster Linie wurde eine Verdünnung der RNA verwendet, die sowohl den Zwischenschritt der Reversen Transkription, als auch die eigentliche RT-PCR enthält. Um die Validierung der Methodik zu vervollständigen wurde, die



## 4. Ergebnisse

---

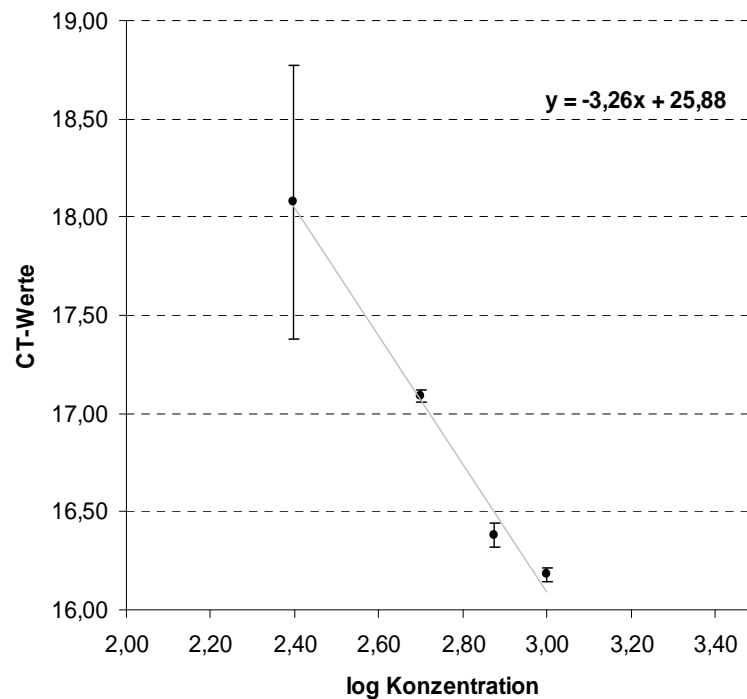
Effizienz auch für Verdünnungsreihen einer bereits revers transkribierten cDNA bestimmt.

### 4.2.2.1. Effizienz-Bestimmung bei Standardkurven mit RNA-Verdünnung

Die folgenden Schaubilder zeigen die Ergebnisse bei Anwendung 3 verschiedener Primer (Anker, Random und Oligo dT) bei der Reversen Transkription sowie der Haushalts-Gene GAPDH und ACTB bei der RT-PCR:

(1) Random Primer:

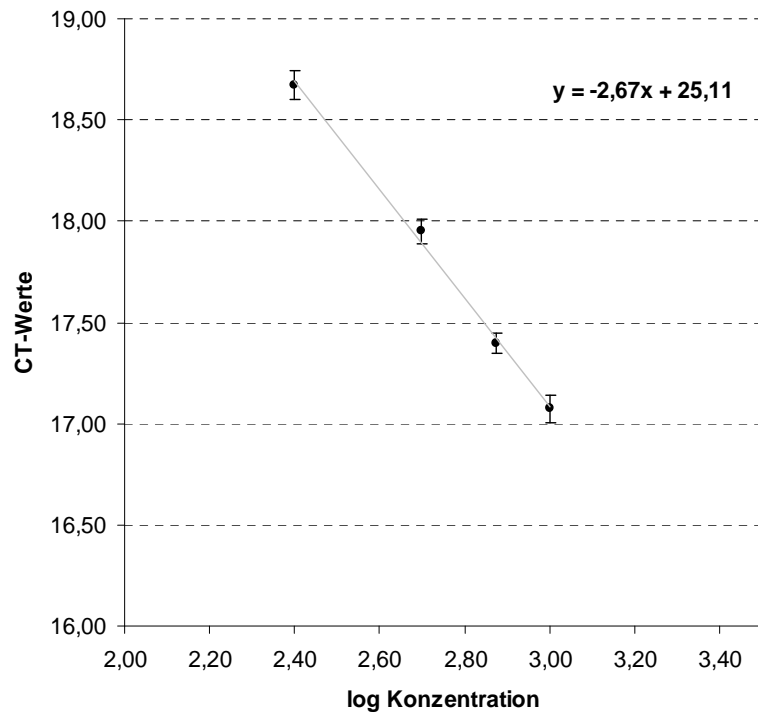
Abb. 22: GAPDH (Random Primer, RNA-Verdünnung)



## 4. Ergebnisse

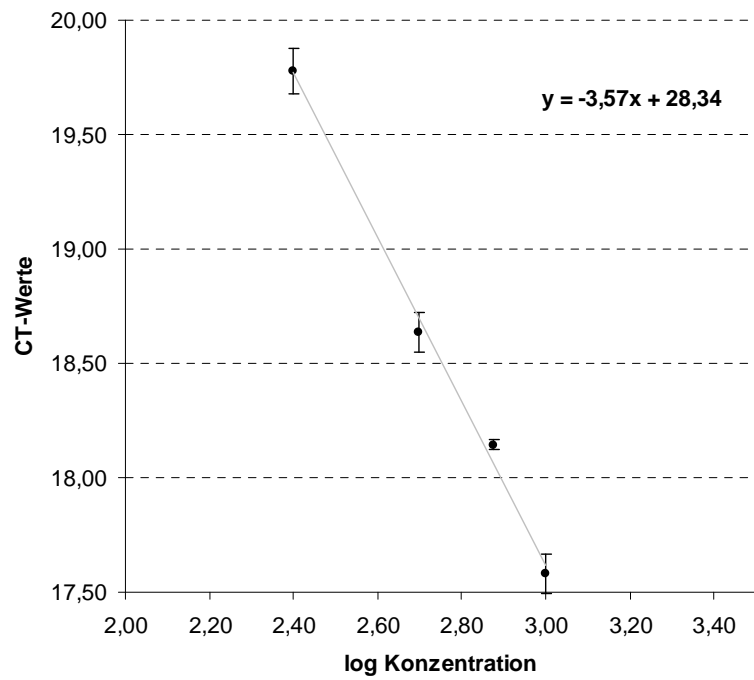
---

Abb. 23: GAPDH (Random Primer, RNA-Verdünnung)



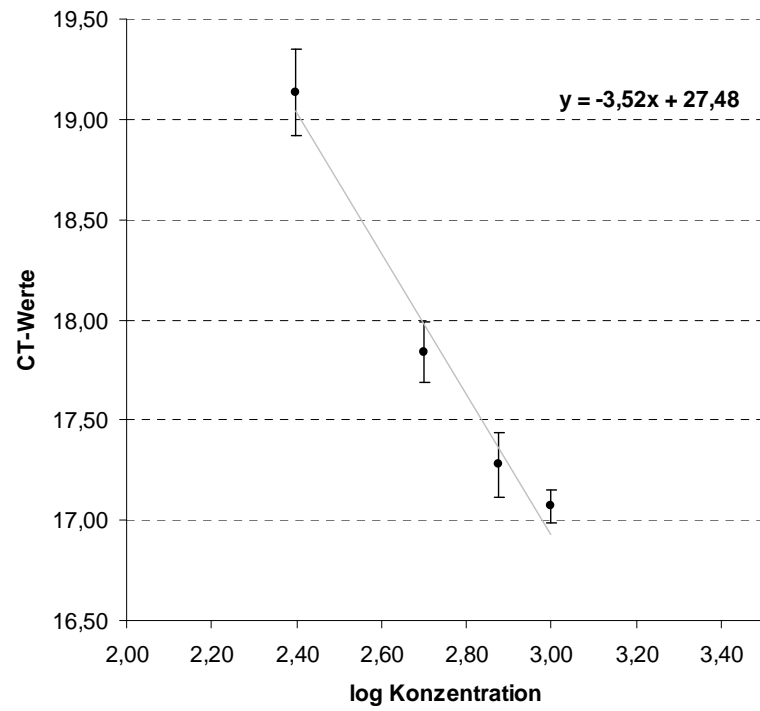
(2) Anker Primer:

Abb. 24: GAPDH (Anker Primer, RNA-Verdünnung)



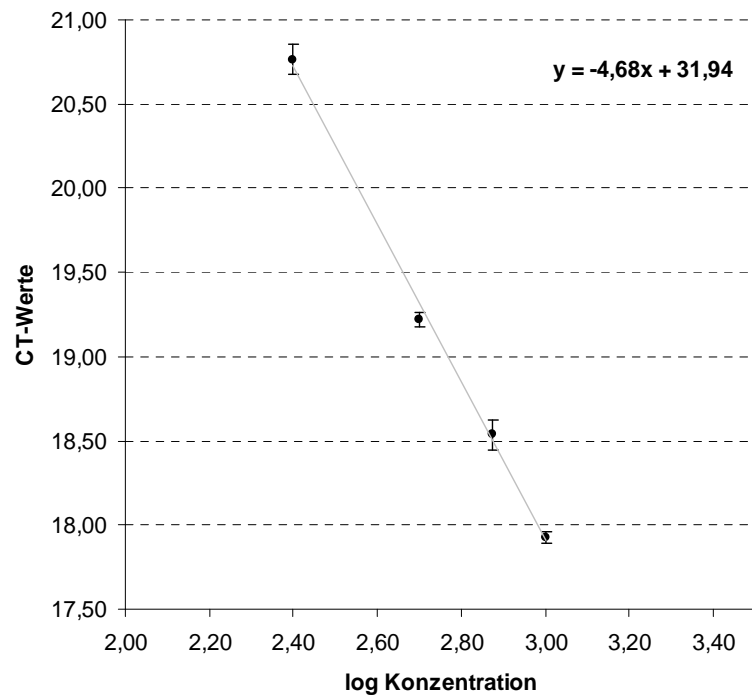
## 4. Ergebnisse

Abb. 25: ACTB (Anker Primer, RNA-Verdünnung)



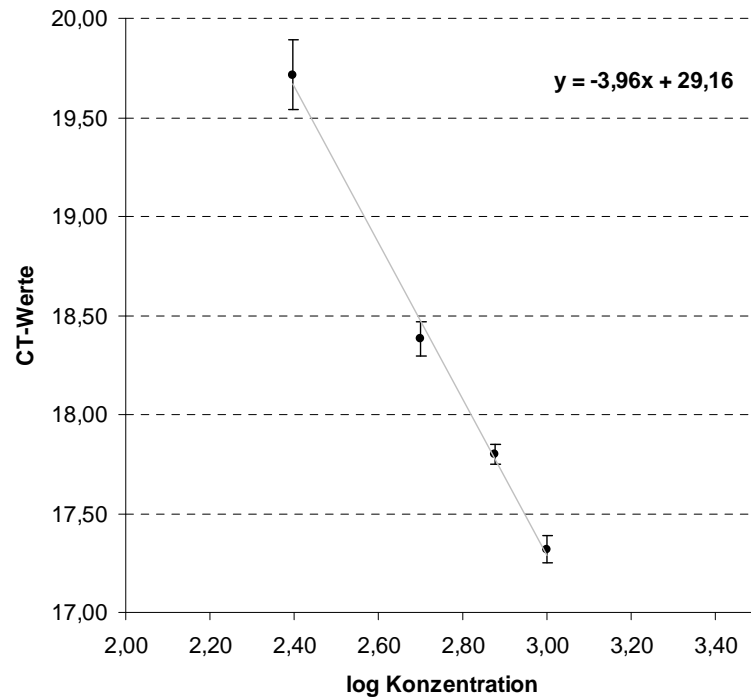
(3) Oligo dT Primer:

Abb. 26: GAPDH (Oligo dT Primer, RNA-Verdünnung)



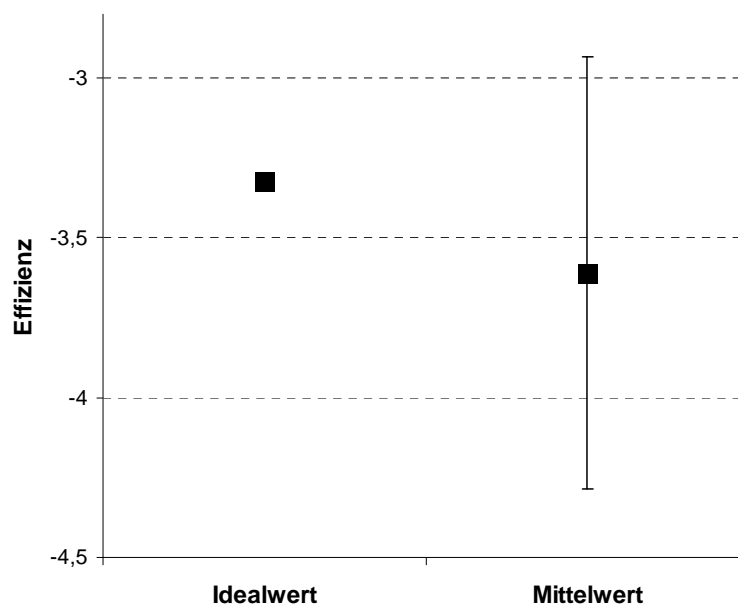
## 4. Ergebnisse

Abb. 27: ACTB (Oligo dT Primer, RNA-Verdünnung)



Der Mittelwert der Steigungen der erstellten Standardkurven beträgt  $-3,61 \pm 0,68$ , was einer Effizienz von 1,89 entspricht.

Abb. 28: Idealwert und mittlere Steigung (+ Standardabweichung) bei RNA-Verdünnung



## 4. Ergebnisse

---

Betrachtet man den Mittelwert mitsamt Standardabweichung als Intervall in einem Koordinatensystem, so wird deutlich, dass sich der Idealwert im selbigen Bereich befindet. Es kann somit von einer sich dem Idealwert annähernden Effizienz ausgegangen werden.

Bei Separation der einzelnen Steigungswerte bezüglich der verwendeten Reversen-Transkriptions-Primer zeigen die Anker-Primer mit einem Mittelwert von  $-3,55 \pm 0,04$  die geringste Abweichung vom Idealwert sowie die kleinste Standardabweichung. Random Primer, mit einer mittleren Steigung von  $-2,97 \pm 0,42$  und Oligo dT Primer, mit  $-4,32 \pm 0,51$  liegen wenig ober- bzw. unterhalb des Idealwertes.

### 4.2.2.2. Effizienz-Bestimmung bei Standardkurven mit cDNA-Verdünnung

Zur Bestätigung der unter 4.2.1. bereits vorgestellten Ergebnisse wurde mit die Standard-RNA mit Anker Primern revers transkribiert, draufhin verdünnt und anschließen unter Verwendung der Haushalts-Gene FASN 1 und FASN 4 amplifiziert. Hierbei zeigten sich folgende Ergebnisse:

Abb. 29: FASN1 (Anker Primer, cDNA-Verdünnung)

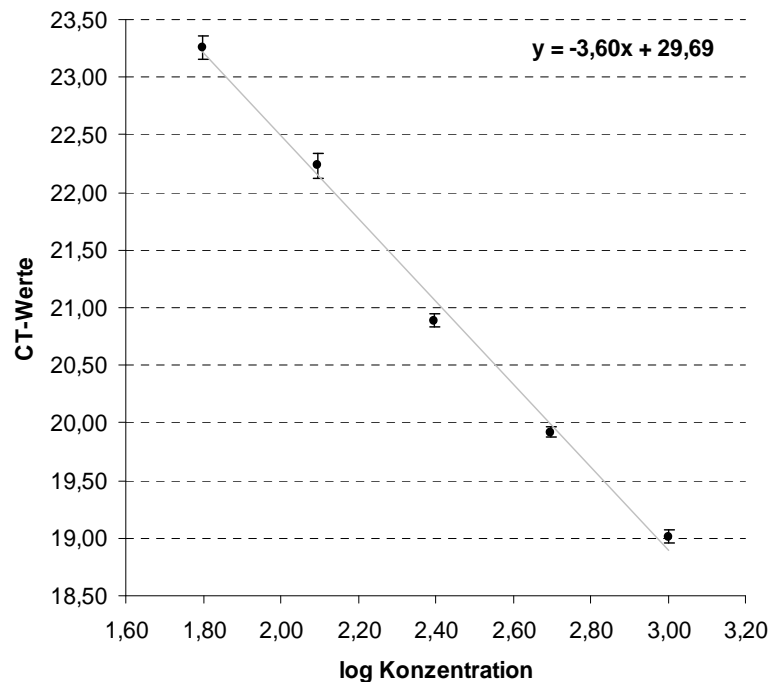
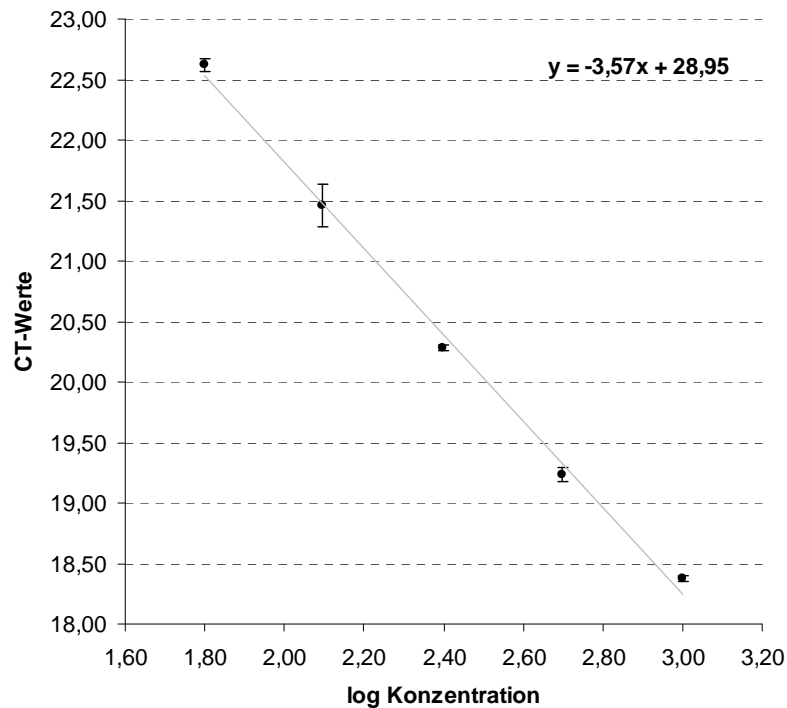


Abb. 30: FASN4 (Anker Primer, cDNA-Verdünnung)



Auch hier kann mit einer mittleren Steigung von  $-3,59 \pm 0,02$  und einer daraus resultierenden Effizienz von 1,90 von einem Ergebnis gesprochen werden, was die Anwendbarkeit der Methodik bestätigt und weitere, hierauf aufbauende Versuche zulässt.

### **4.3. Die Auswirkungen der Leichenliegezeit auf die Realtime-PCR-Ratio**

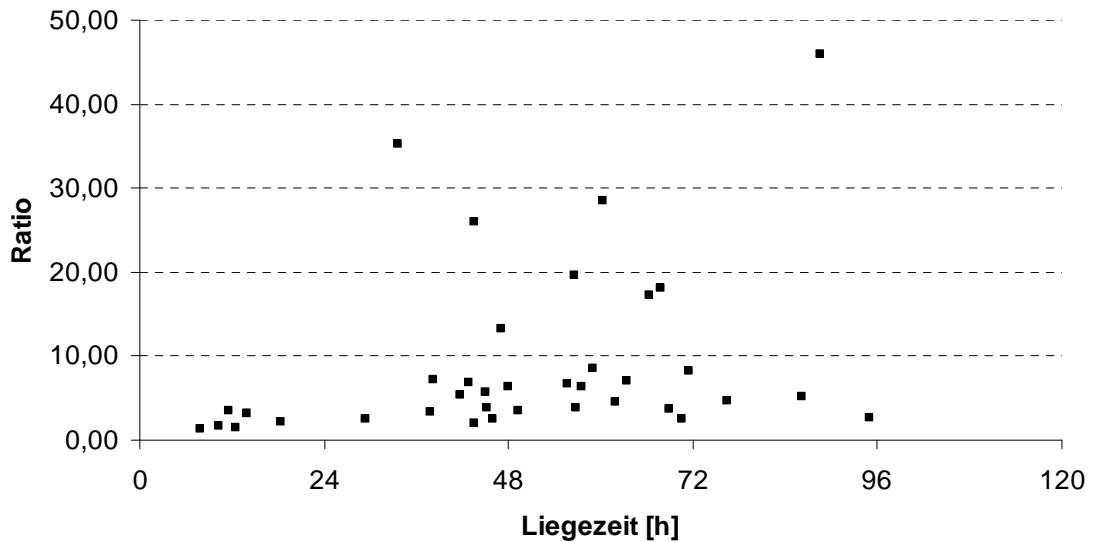
Eine entscheidende Frage, die sich nun stellt, ist, ob die jeweilige Leichenliegezeit einen kontinuierlich zerstörenden Einfluss auf die Realtime-PCR-Ratio hat und somit eine zeitabhängige Degeneration der RNA aufzeigt. Proben mit kurzem Postmortalintervall müssten demnach wenig Abweichung vom mitgelaufenen Standard haben, was zu einer sehr kleinen Ratio führen würde, wobei eine längere Leichenliegezeit gegenteiliges Verhalten an den Tag läge. Im Idealfall ließe sich mit Hilfe der experimentell bestimmten Ratio auf ein mehr oder weniger eng gefasstes Postmortalintervall schließen.

## 4. Ergebnisse

---

Die nun folgenden Schaubilder zeigen eine Auftragung der Realtime-PCR-Ratios gegen die Leichenliegezeit, sowie die Korrelation beider Werte. Für die Reverse Transkription wurden Anker- und Random Primer verwendet, für die Realtime-PCR alle bereits vorgestellten Haushalts-Gene.

Abb. 31: Ratio vs. LLZ bei Anker-ACTB-Priming

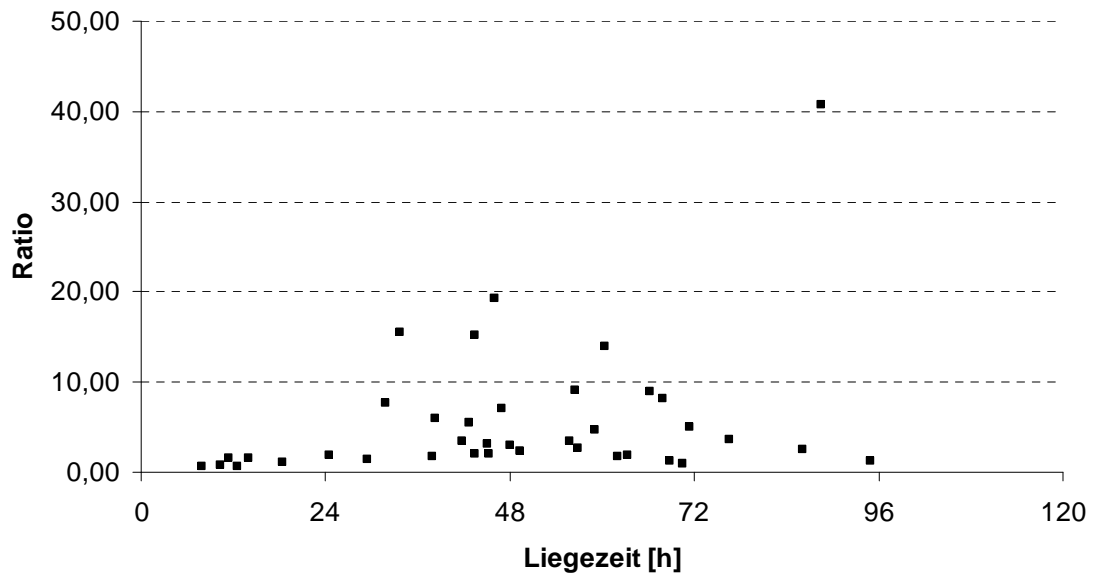


→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,29$  bei  $n = 38$  und Amplifikation mit Anker- und ACTB-Primern

## 4. Ergebnisse

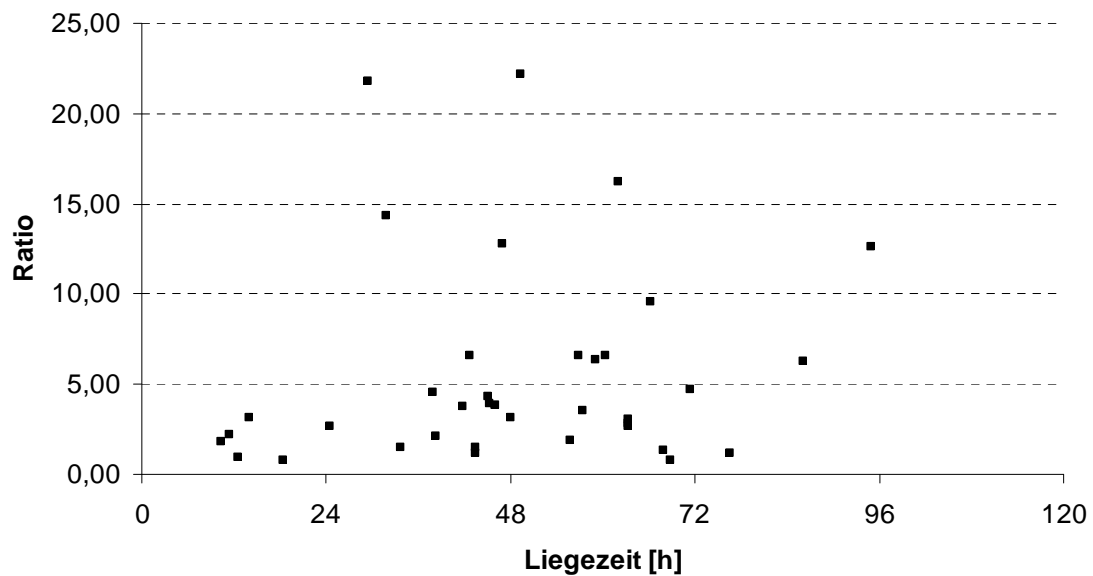
---

Abb. 32: Ratio vs. LLZ bei Anker-FASN1-Priming



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,30$  bei  $n = 38$  und Amplifikation mit Anker- und FASN 1-Primern

Abb. 33: Ratio vs. LLZ bei Anker-FASN4-Priming



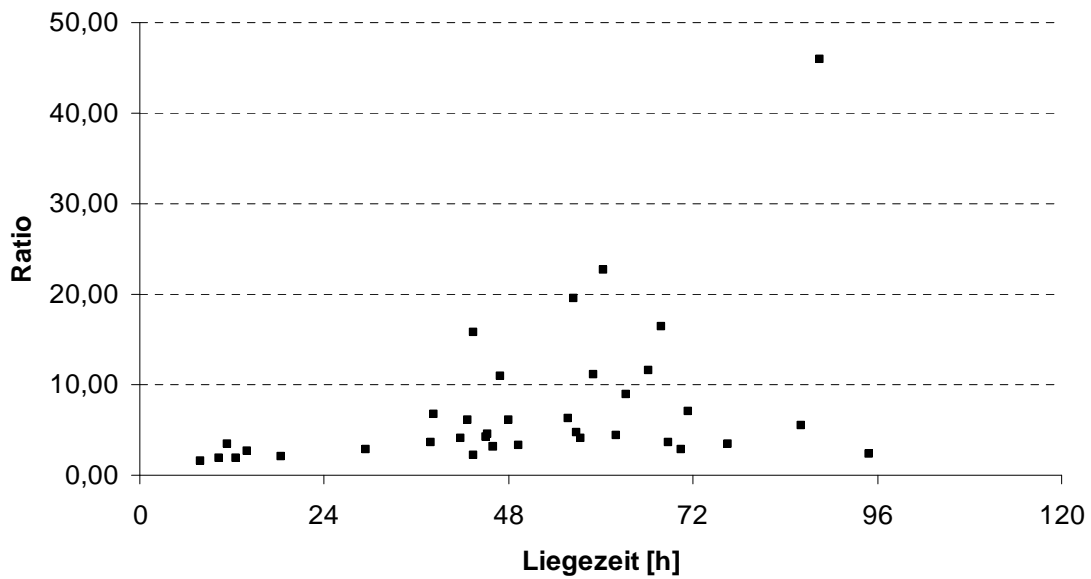
→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,09$  bei  $n = 37$  und Amplifikation mit Anker- und FASN 4-Primern



## 4. Ergebnisse

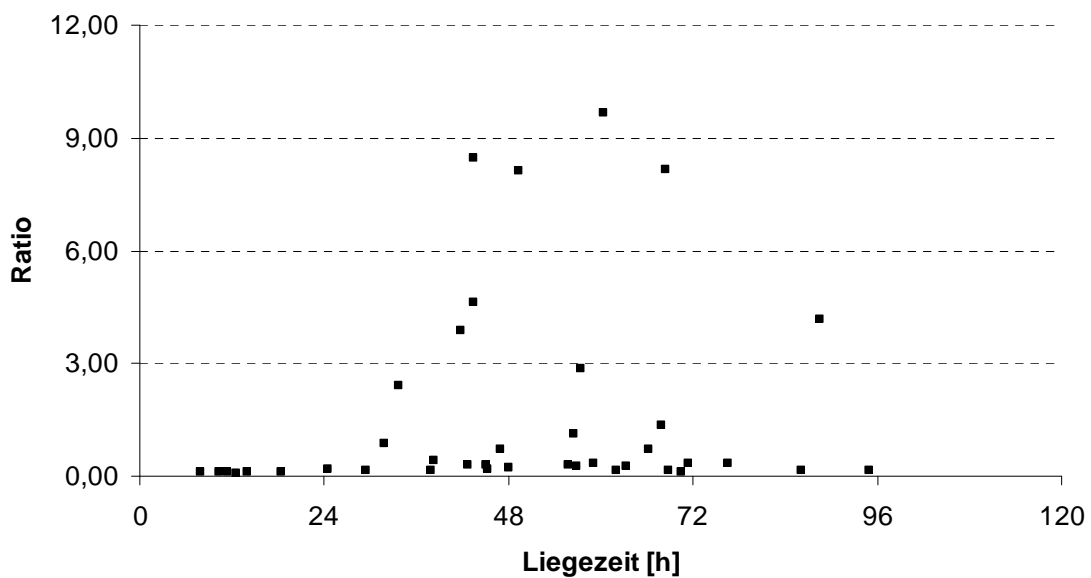
---

Abb. 34: Ratio vs. LLZ bei Anker-GAPDH-Priming



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,41$  bei  $n = 36$  und Amplifikation mit Anker- und GAPDH-Primern

Abb. 35: Ratio vs. LLZ bei Anker-GAPDH2-Priming

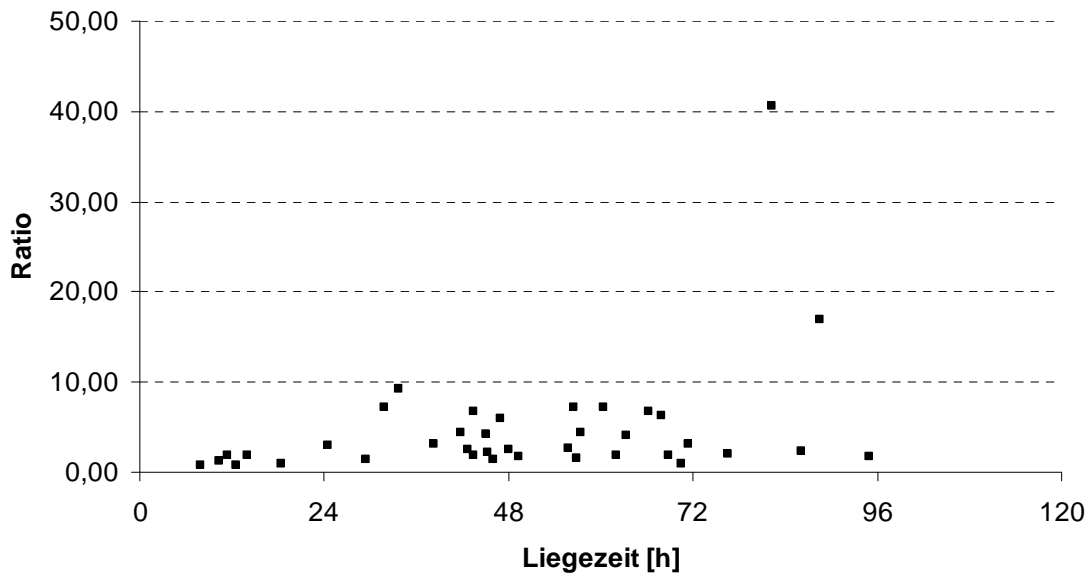


→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,16$  bei  $n = 39$  und Amplifikation mit Anker- und GAPDH 2-Primern

## 4. Ergebnisse

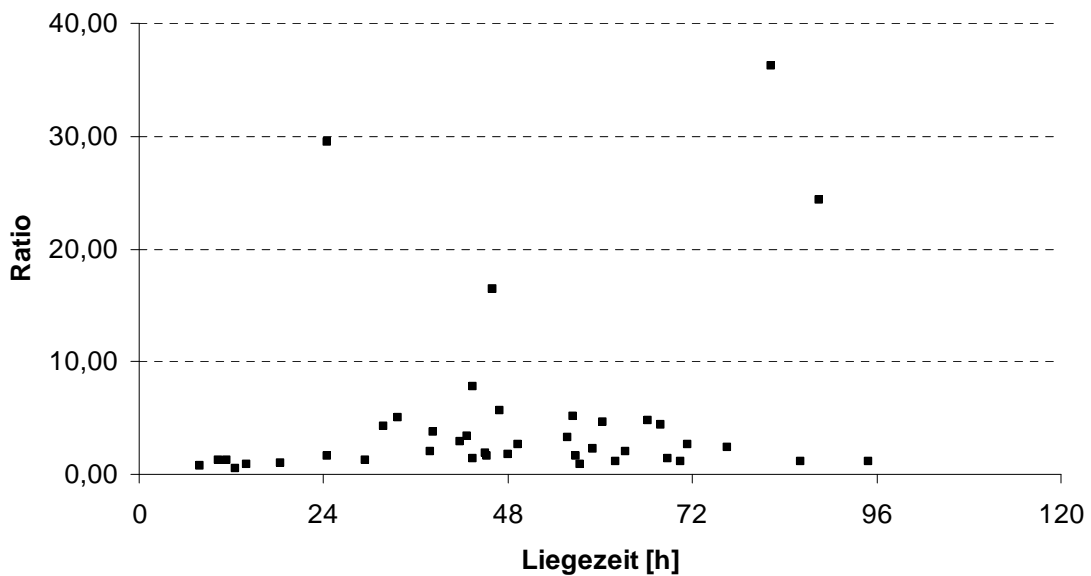
---

Abb. 36: Ratio vs. LLZ bei Random-ACTB-Priming



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,36$  bei  $n = 38$  und Amplifikation mit Random- und ACTB-Primern

Abb. 37: Ratio vs. LLZ bei Random-FASN1-Priming

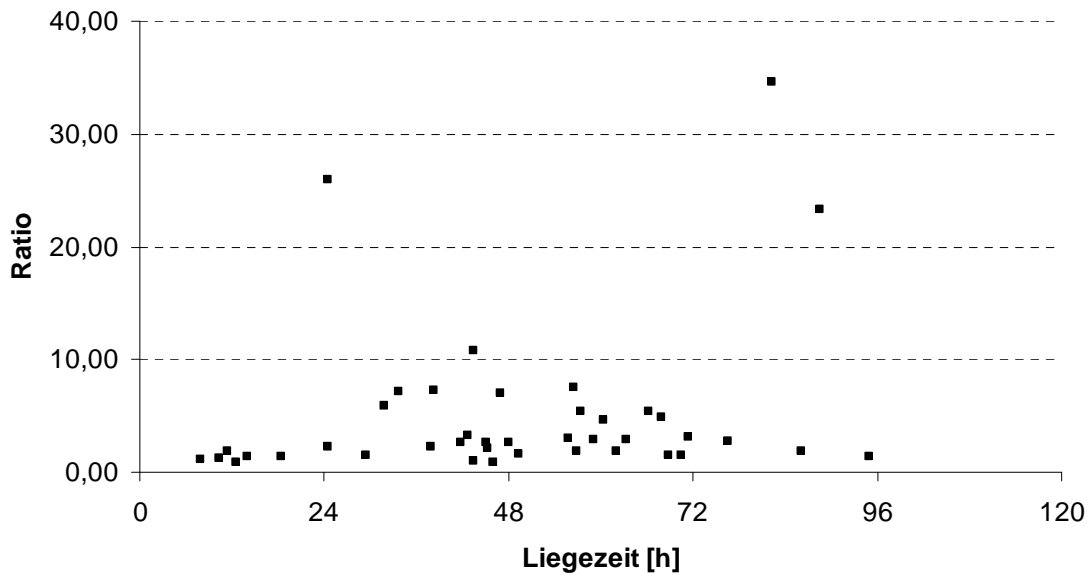


→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,22$  bei  $n = 41$  und Amplifikation mit Random- und FASN 1-Primern

## 4. Ergebnisse

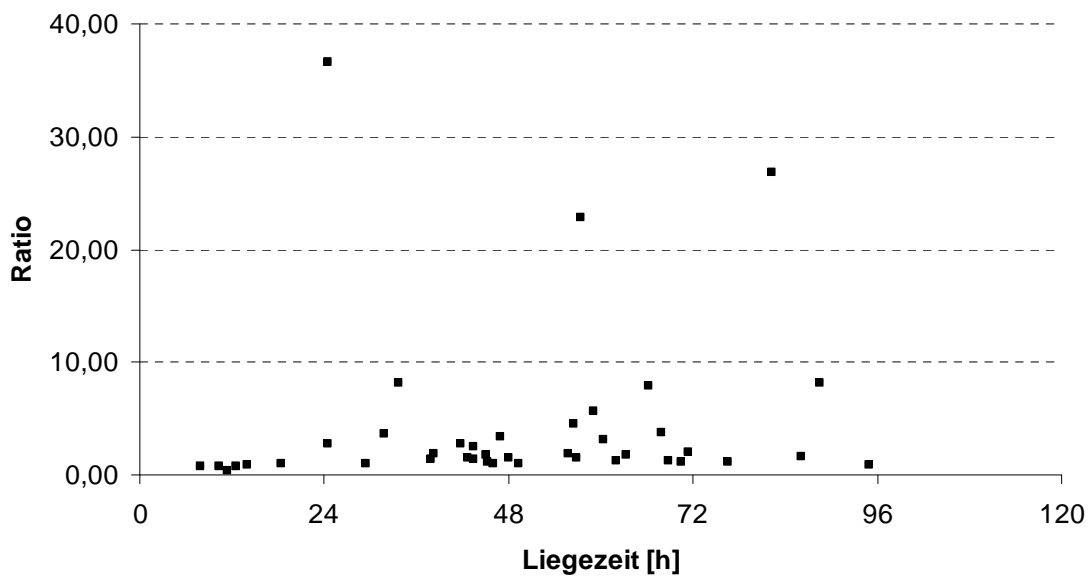
---

Abb. 38: Ratio vs. LLZ bei Random-FASN4-Priming



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,24$  bei  $n = 41$  und Amplifikation mit Random- und FASN 4-Primern

Abb. 39: Ratio vs. LLZ bei Random-GAPDH-Priming

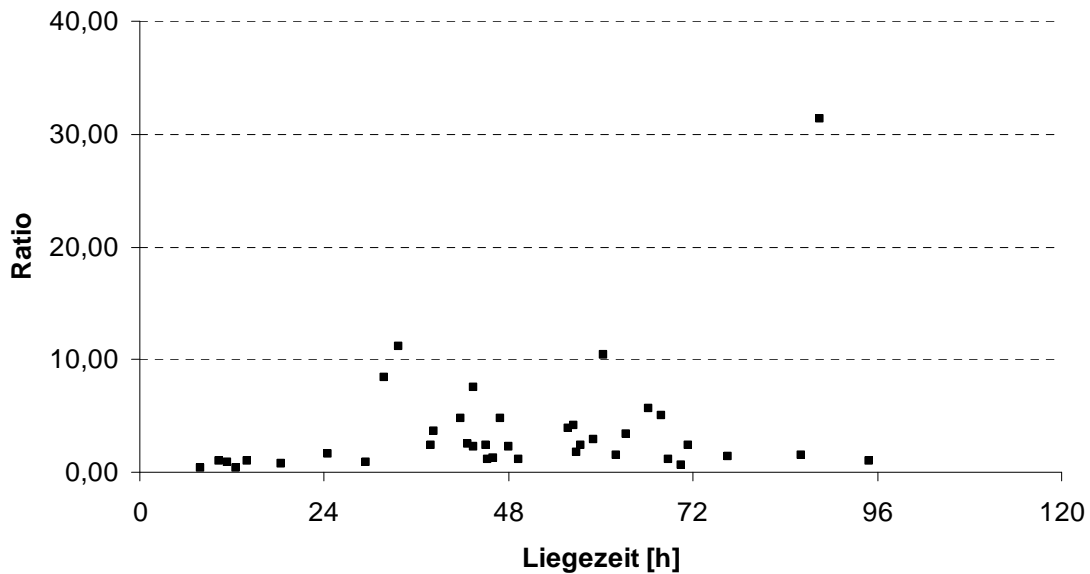


→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,10$  bei  $n = 41$  und Amplifikation mit Random- und GAPDH-Primern

## 4. Ergebnisse

---

Abb. 40: Ratio vs. LLZ bei Random-GAPDH2-Priming



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,30$  bei  $n = 39$  und Amplifikation mit Random- und GAPDH-Primern

Die Korrelationskoeffizienten bewegen sich zwischen  $r = 0,10$  und  $r = 0,41$  und bilden einen Mittelwert von  $r = 0,26$ . Somit muss davon ausgegangen werden, dass zwischen der Realtime-PCR-Ratio und der Leichenliegezeit im Intervall von 0 - 96h kein direkt linearer oder exponentieller Zusammenhang besteht.

Generell zeigt sich zwar ein Anstieg der Ratios mit zunehmender Leichenliegezeit entsprechend einer abnehmenden mRNA-Amplifizierbarkeit, allerdings sieht man bereits bei orientierender Betrachtung der Punktwolke, dass diese breit streut und zwar eine Tendenz, aber keinen eindeutigen Verlauf zeigt.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. RNA-Isolation und Stabilität

Während die DNA schon seit vielen Jahren, sowohl in der wissenschaftlichen Arbeit als auch in der praktischen gerichtsärztlichen Tätigkeit, einen hohen Stellenwert einnimmt, ist die Isolation und Weiterverarbeitung von RNA erst seit relativ kurzer Zeit aktuell. Beispielsweise konnten RNA-analytische Verfahren eingesetzt werden, um Art und Herkunft verschiedener Spuren festzustellen. Auf diese Weise kann eine Blutspur unbekannter Herkunft entweder einer Verletzung oder aber der Menstruationsblutung einer Frau zugeordnet werden (Bauer et al 2004). Verschiedenste Probleme mussten hierbei erst gelöst werden. So führt die ubiquitäre Anwesenheit von Ribonucleasen (Davidson et al 1976) oft zu einem sehr schnellen RNA-Abbau, vor allem in enzymreichen Geweben wie z.B. Pancreas. Durch den Einsatz chemischer Stoffe wie Guanidiniumthiocyanat und Mercaptoethanol wird die Isolation dann auch aus derartigen Geweben möglich (Chirgwin et al 1979), worauf sich auch die hier gewählte RNA-Isolationmethode (Chomczynski et al 1987) stützt. In dieser Studie wurden nun noch weitere Vorkehrungen getroffen, wie z.B. der Einsatz von Ribonukleaseinhibitoren, die Desinfektion der Glasmaterialien mit DEPC oder die Verwendung ribonukleasefreier Einmalprodukte, die eine Kontamination mit Ribonucleasen verhindern sollen. Auch eine eventuelle Verunreinigung der Proben mit DNA konnte ausgeschlossen werden.

Einige Studien haben sich nun damit beschäftigt, wie lange intakte RNA vor dem unwiderruflichen Abbau aus postmortalem Gewebe isoliert werden kann. Es zeigten sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben. Während RNA aus Magen und Pancreas schon nach 2 h degradiert (Humphreys-Beher et al 1986) ebenso wie RNA aus der Leber (Finger et al 1987), so zeigt sich bei der Verwendung von Lungengewebe eine postmortale Stabilität von bis zu 20 h (Humphreys-Beher et al 1986). Im Falle von menschlichem Gehirn blieb der gesamte RNA-Gehalt bis zu 48 h stabil (Harrison et al 1995), was auch bei der Verwendung von Knochen zu erwarten

ist (Kuliwaba et al 2005). Alle diese Studien beziehen sich auf den gesamten RNA-Gehalt. Beim Betrachten der biologischen Aktivität kann diese bei Untersuchung menschlicher Gehirnproben sogar noch nach 84 Stunden postmortal nachgewiesen werden (Perrett et al 1988).

Die in dieser Studie verwendeten Proben aus menschlichem Gehirn wurden nach der Obduktion bei -40 °C gelagert. Dies gewährleistet den Erhalt der zum Obduktionszeitpunkt vorhandenen RNA-Qualität und -Quantität (Harrison et al 1995).

Augenscheinlich lässt der nahezu abgeschlossene Raum im Inneren des menschlichen Schädels auf wenig äußere Einflüsse, die das Hirngewebe selbst und auch die RNA während des postmortalen Intervalls verändern, schließen. Welche Faktoren nun einen grundlegend verändernden Einfluss haben, ist noch weitgehend ungeklärt. Preece et al untersuchten 2003 menschliche postmortale Gehirnproben auf ihren Gesamtgehalt an RNA sowie verschiedene eventuell beeinflussende Gegebenheiten. Sie fanden einen generell höheren cerebralen RNA-Gehalt bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Individuen. Des Weiteren schien der pH-Wert des Gehirns mit dem RNA-Gehalt zu korrelieren ebenso wie das Alter zum Todeszeitpunkt. Ein direkter Zusammenhang zwischen pH-Wert und Alter ergab sich aber nicht, jedoch korrelierte der pH-Wert bei Patienten mit Morbus Alzheimer mit dem postmortalen Intervall, was sich in der Kontrollgruppe aber nicht bestätigen ließ.

Während in den genannten Studien keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Hirnregionen gemacht wurde, konnte in dieser Studie ein weitaus besserer RNA-Gehalt bei Verwendung von Anteilen der Hirnrinde, im Gegensatz zu Proben aus der Markregion, erzielt werden.

### **5.2. Amplifikation**

#### **5.2.1. RT-PCR**

Sowohl in der allgemeinen mikrobiologischen Forschung als auch in den Arbeiten über das postmortale Verhalten von RNA bedienen sich zahlreiche Autoren der Methode der Reversen Transkription als auch der der PCR (z.B.

Yasojima et al 2001, Preece et al 2003, Kuliwaba et al 2005). Während die Polymerase-Ketten-Reaktion erstmals von Mullis et al 1986 beschrieben und angewandt wurde, entdeckten Temin et al und Baltimore et al nahezu zeitgleich das Enzym Reverse Transkriptase, welches daraufhin die Transkription von RNA zu cDNA möglich machen sollte.

In der Literatur zeigt sich diese Vorgehensweise als geeignet, um mRNA aus postmortalen Proben zuverlässig zu beurteilen (Inoue et al 2002).

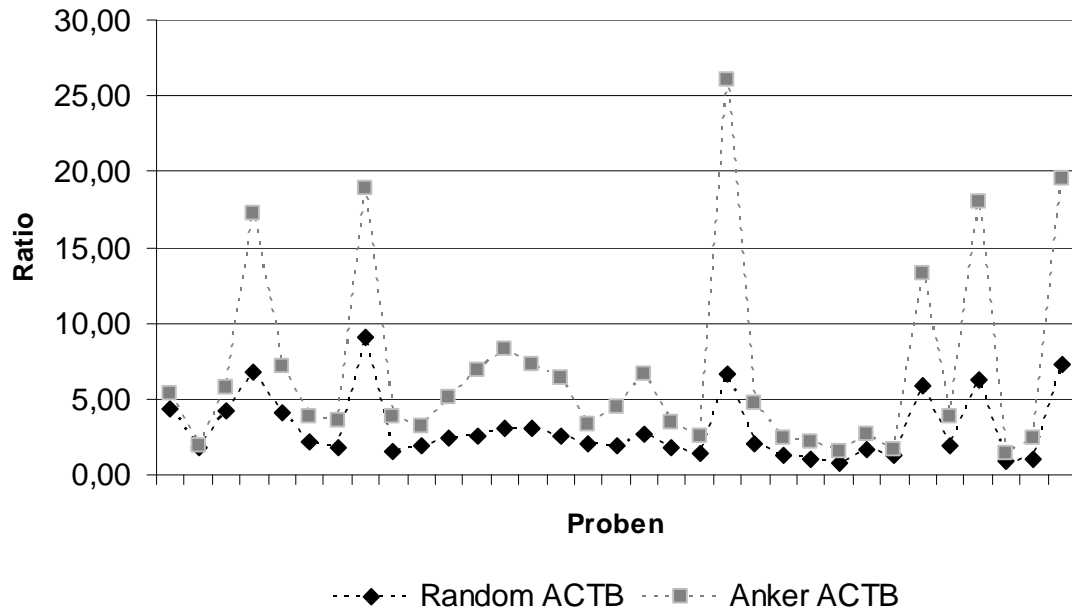
In dieser Arbeit wurde die Methode für die Verwendung von menschlichem Gehirn mit unterschiedlicher Leichenliegezeit erneut evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Reverse Transkription und deren Arbeitsschritte die RNA-Quantität nicht verändert wird, wodurch die entsprechende cDNA als geeignetes Äquivalent weiter verwendet werden kann.

### **5.2.2. Einfluss und Auswirkungen der RT-Primer**

#### 5.2.2.1. Vergleich von Random und Anker Primern

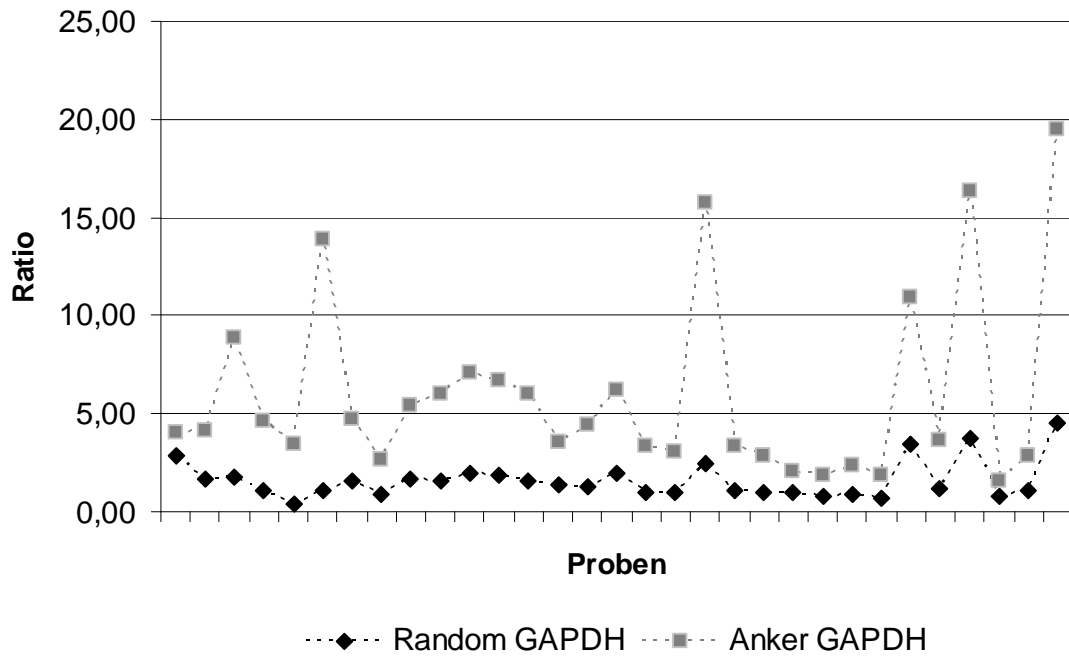
Die folgenden Schaubilder zeigen einen Vergleich der Amplifikationsratios für die verschiedenen Haushalts-Gene zwischen beiden Reversen Transkriptions-Primern (Anker und Random).

Abb. 41: Random ACTB vs. Anker ACTB



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,93$

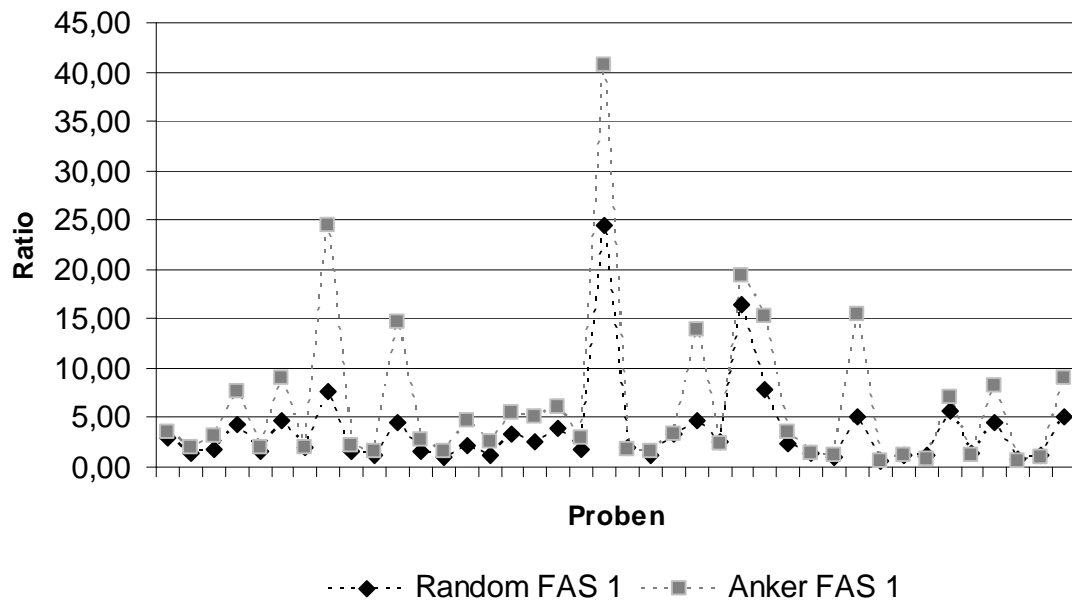
Abb. 42: Random GAPDH vs. Anker GAPDH



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,81$

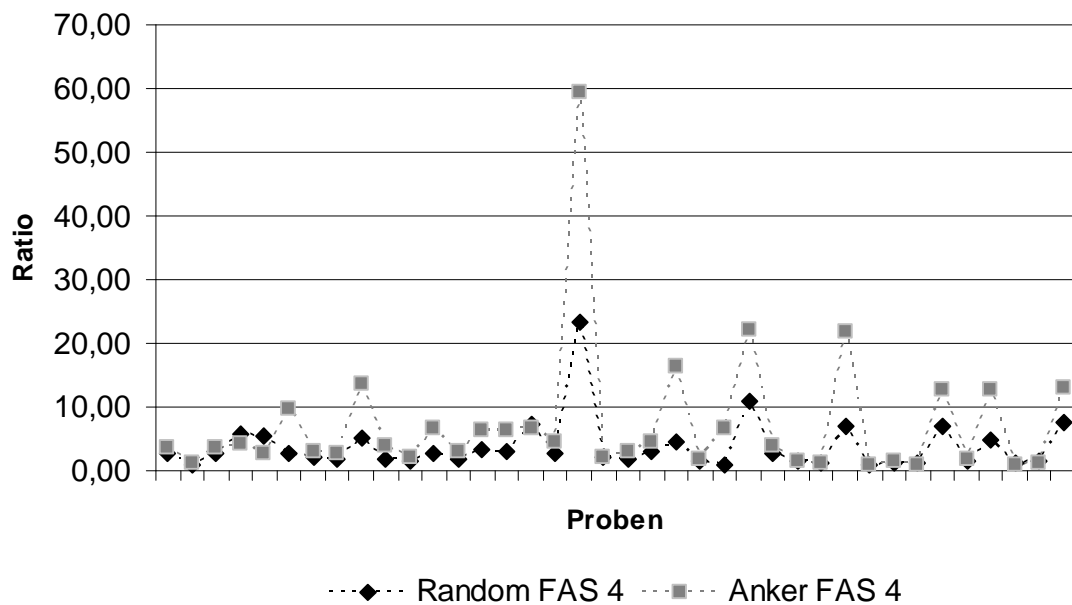


Abb. 43: Random FASN 1 vs. Anker FASN 1



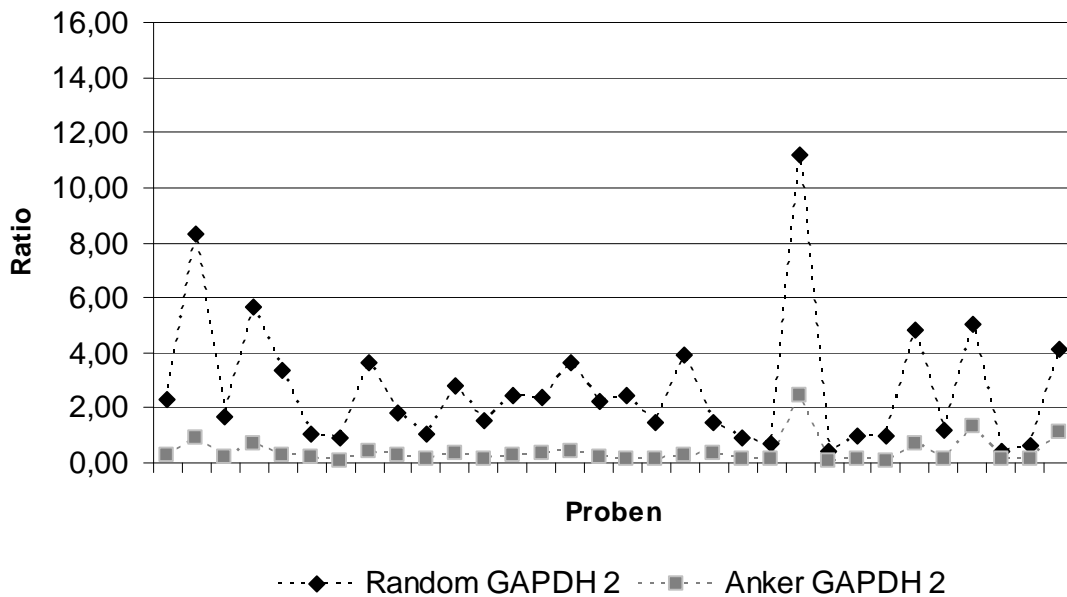
→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,92$

Abb. 44: Random FASN 4 vs. Anker FASN 4



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,94$

Abb. 45: Random GAPDH 2 vs. GAPDH 2



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,89$

Überraschenderweise hatte die Verwendung von random hexamer oder Anker-Primern keine differentielle Amplifikation im Hinblick auf die Leichenliegezeit zur Folge. Zwar wurde mit random Primern bei nahe zu allen Haushaltsgenen eine höhere Amplifikationsausbeute, erkennbar an der niedrigeren Ratio, erzielt, allerdings waren die Unterschiede zu den Ergebnissen mit Anker-Primern stets im gleichen Verhältnis, was die stets positiven und zwischen 0,81 und 0,94 liegenden Korrelationskoeffizienten beweisen. Die einzigen Aufzeichnungen, bei denen mit Anker Primern eine höhere Ausbeute bzw. niedrigere Ratio erzielt wurde, waren diejenigen mit GAPDH 2 als PCR-Primer.

#### 5.2.2.1. Anker und Random Primer-Differenz

Ausgehend von der Frage, ob die verschiedenen Reverse-Transkriptions-Primer derart unterschiedliche cDNA generieren, dass es einen forensischen Nutzen aufweisen könnte, wurden die Differenzen der Ratios von Anker und Random Primern für die verschiedenen Haushalts-Gene gegen die Leichenliegezeit aufgetragen. Theoretische Überlegungen sprächen für eine differentielle Amplifikation bei Degeneration der RNA in Form von Strangbrüchen bzw. ungerichteter Zerstörung, wobei die Differenz der

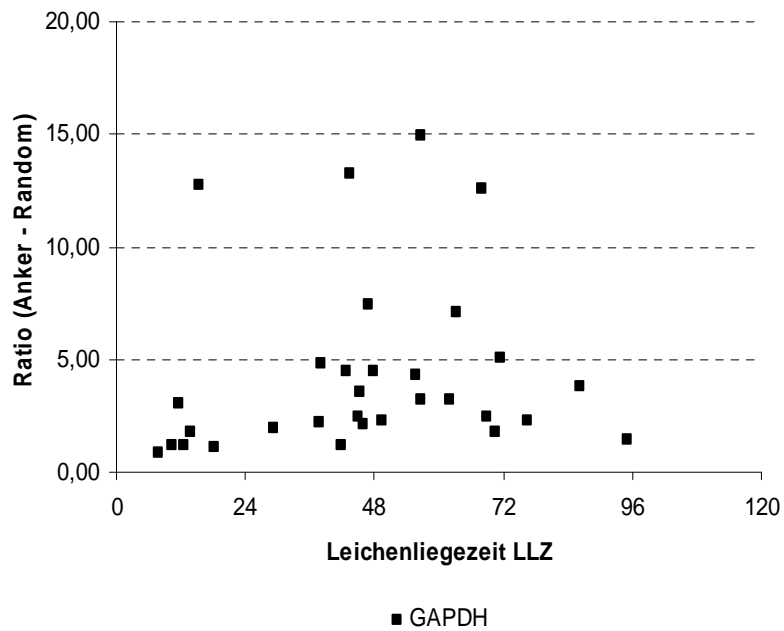
## 5. Diskussion

---

unterschiedlichen reversen Transkription mit dem Grad des Abbaus, also auch der Leichenliegezeit, korrelieren müsste.

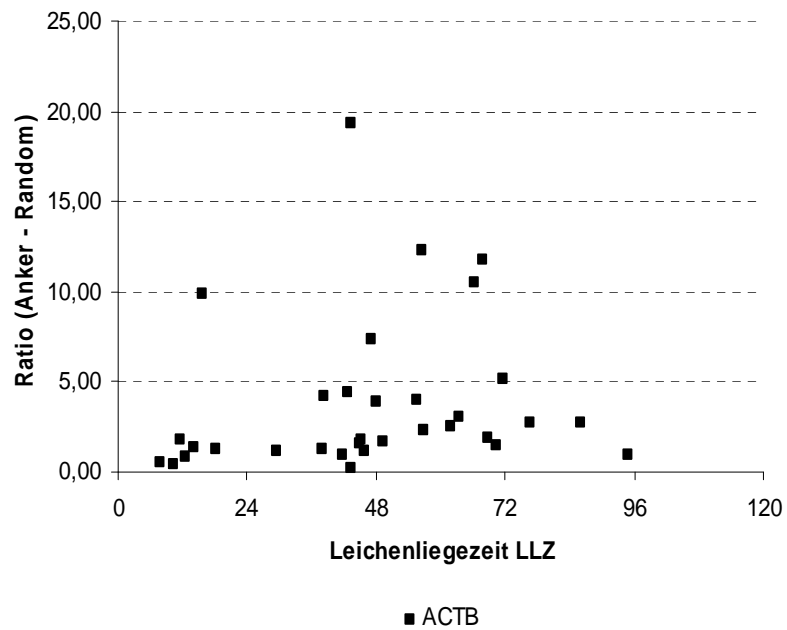
Folgende Schaubilder veranschaulichen diese Ansätze für die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Haushalts-Gene.

Abb. 46: Ratio-Differenz für GAPDH gegen die LLZ



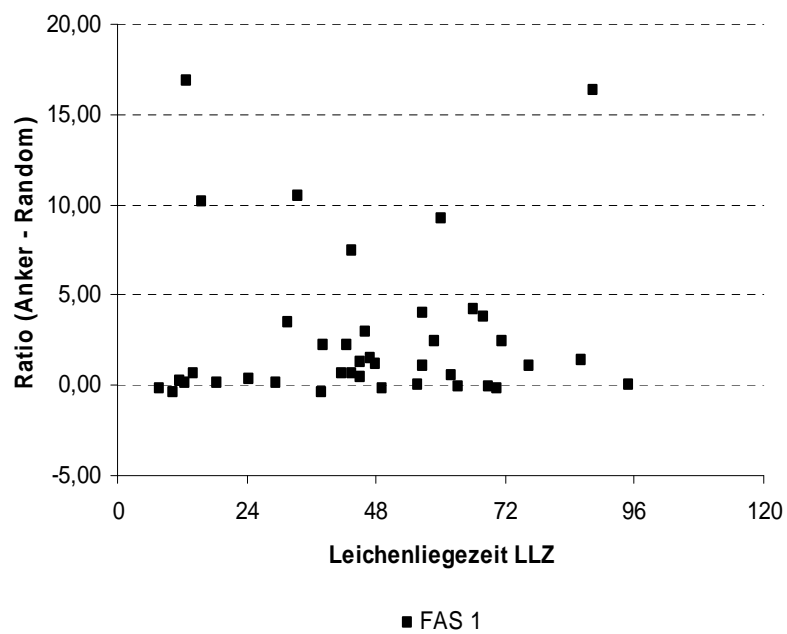
→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,13$

Abb. 47: Ratio-Differenz für ACTB gegen die LLZ



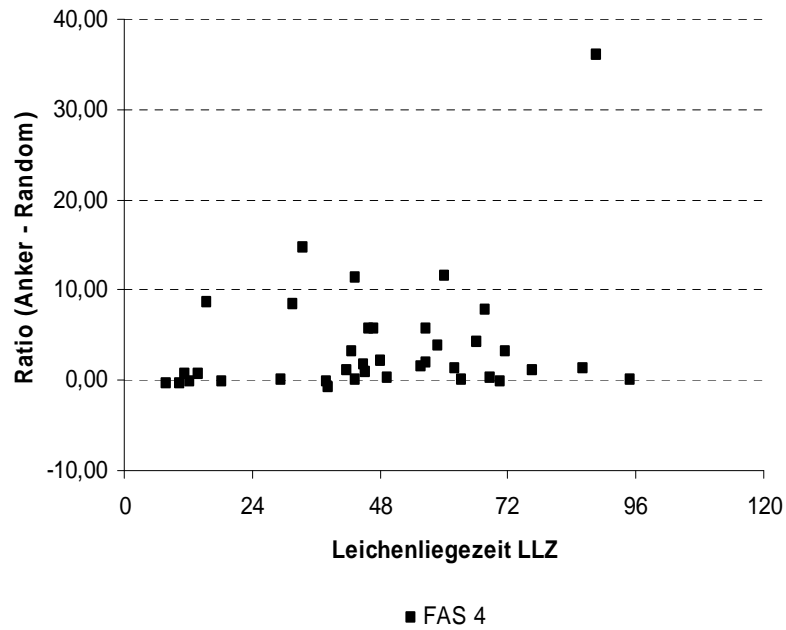
→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,15$

Abb. 48: Ratio-Differenz für FASN 1 gegen die LLZ



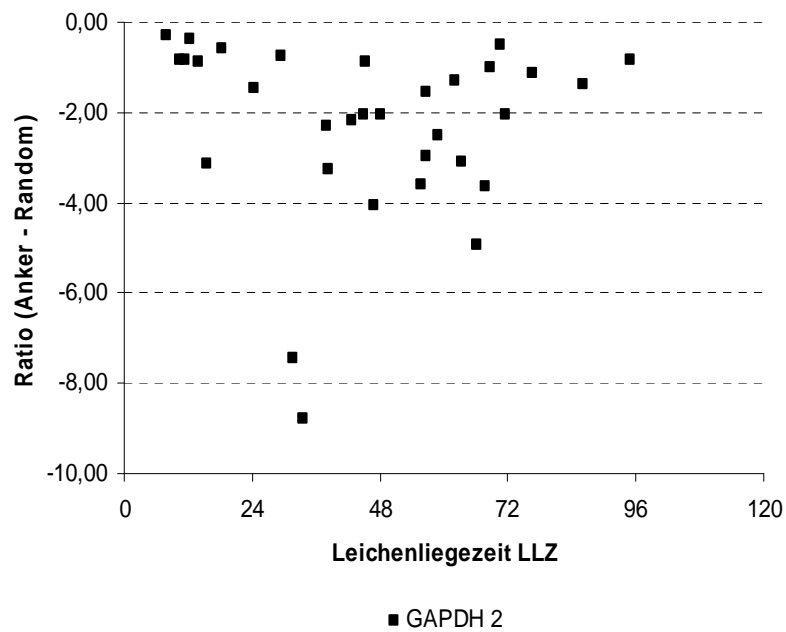
→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,02$

Abb. 49: Ratio-Differenz für FASN 4 gegen die LLZ



→ Korrelationskoeffizient  $r = 0,25$

Abb. 50: Ratio-Differenz für GAPDH 2 gegen die LLZ



→ Korrelationskoeffizient  $r = -0,05$

Es finden sich Punktwolken ohne jede Korrelation (Korrelationskoeffizienten zwischen - 0,05 und 0,25) und nicht, wie vielleicht erwartet, eine Zunahme der Differenz bei höheren Postmortalintervallen. Eine Erklärung für dieses Phänomen fällt schwer, möglicherweise erfolgt die Degradation doch eher vom 5'-Ende her oder nach einer Alles-oder-Nichts-Regel, das heißt RNAs werden nicht zunächst nur partiell fragmentiert sondern, wenn betroffen, gleich vollständig abgebaut, während die nicht betroffenen Moleküle zunächst relativ intakt verbleiben.

Die Verwendung verschiedener Primer mit unterschiedlichen Ansätzen bei der Reversen Transkription ergab somit keinen grundsätzlich veränderten Amplifikationsverlauf. Während Skrypina et al 2003 vermuteten, dass Amplifikation mit Oligo-(dT)-Primern aufgrund der Gebundenheit an das poly-A-Cap und der daraus resultierenden starken Verkürzung bei Degradation in Form von Strangbrüchen zu einer Unterschätzung des RNA-Gehaltes im Gegensatz zu Random-Primern führen würde, konnte in dieser Arbeit trotz der genannten Überlegungen eine einheitliche Amplifikation dokumentiert werden. Es ist somit zu vermuten, dass der RNA-Abbau nicht oder nicht ausschließlich durch Einzelstrangbrüche von statten geht, sondern dass eventuell sogar eine gerichtete Degradation vom 5'-Ende her in Betracht zu ziehen ist.

### **5.2.3. Die verwendeten Haushaltsgene**

Für die PCR wurden die Gene Cyclophilin,  $\beta$ -Actin, GAPDH und FASN ausgewählt, die alle zu den Haushaltsgenen zählen und damit ubiquitär und frei von äußeren Einflüssen exprimiert werden. Alle Gene wurden bereits in verschiedenen anderen Arbeiten als Kontroll-Gene in Expressionsstudien verwendet (Ullmannova et al 2003, Bas et al 2004, Danielson et al 1988, Inoue et al 2002) und sind als Haushaltsgene akzeptiert.

### **5.2.4. PCR-Effizienz**

Insgesamt konnte in dieser Arbeit von einer idealen Effizienz der PCR ausgegangen werden, da in den erstellten Standardkurven eine Verdopplung

der Fluoreszenz pro Zyklus stattfand, was der grundlegenden Zielsetzung entspricht (Wiedemann et al 2004). Die Berechnung der Ratio, die einen Bezug zu einem mitgelaufenen Standardwert herstellt und somit laufspezifische Alterationen herausfiltert, wurde nach der von Pfaffl et al 2004 beschriebenen Formel vorgenommen.

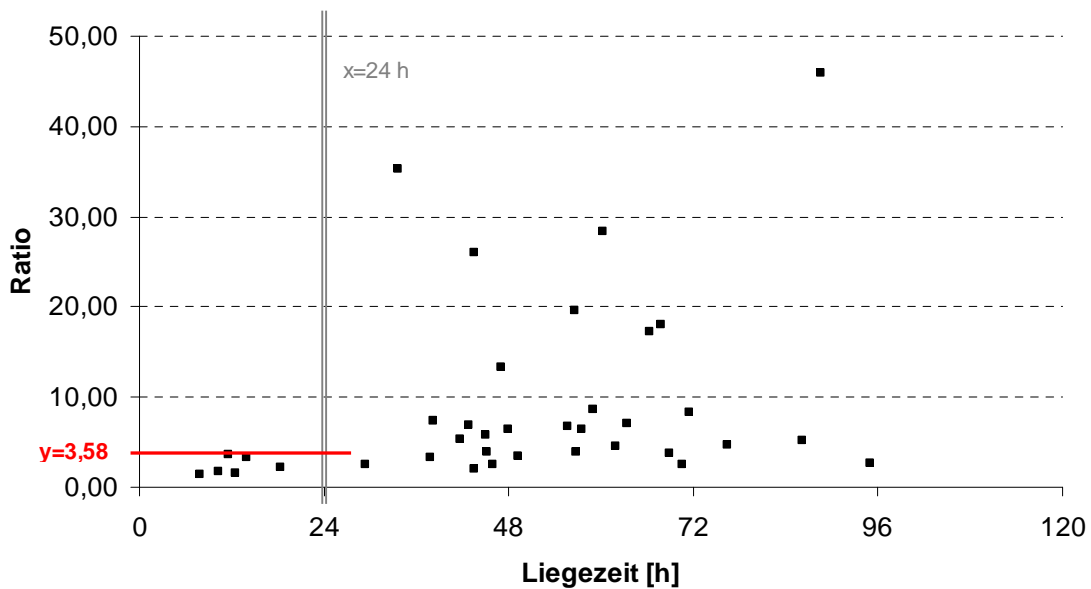
### **5.3. Beziehungen zur Leichenliegezeit**

Ob es eine Beziehung zwischen Leichenliegezeit und RNA-Degradation gibt, scheint in Anbetracht der aktuellen Forschungsergebnisse noch fraglich. In Anlehnung an die Entdeckung, dass die RNA-Degradation in Blutproben signifikant mit dem postmortalen Intervall korreliert (Bauer et al 2003), wurde in dieser Arbeit ebenfalls nach einem Zusammenhang zwischen der cerebralen RNA-Degeneration und dem postmortalen Intervall gefahndet, während aktuelle Ergebnisse einer Studie von Heinrich et al 2007 keine Korrelation zwischen Leichenliegezeit und RNA-Degradation in den von ihnen untersuchten Geweben (Skelettmuskel, Herz und Gehirn) mit einem postmortalen Intervall zwischen 15 und 118 Stunden feststellen konnten.

#### **5.3.1. Das 24-Stunden-Intervall**

Was bei den unter 4.4. aufgeführten Ergebnissen auffällig erscheint ist, dass diejenigen Werte, die sich in einem postmortalen Zeitraum von 0-24 h aufhalten, wenig vom mitgelaufenen Standardwert abweichen und somit eine niedrige Ratio haben. Nach 24 h beginnen die Werte dann breiter zu streuen. Dieses Phänomen zeigt sich in allen unter 4.4. dargestellten Schaubildern. Die folgende Darstellung zeigt stellvertretend für alle vorgestellten Ergebnisse die jeweiligen Grenzwerte.

Abb. 51: Ratio vs. LLZ bei Anker-ACTB-Priming mit Grenzlinien



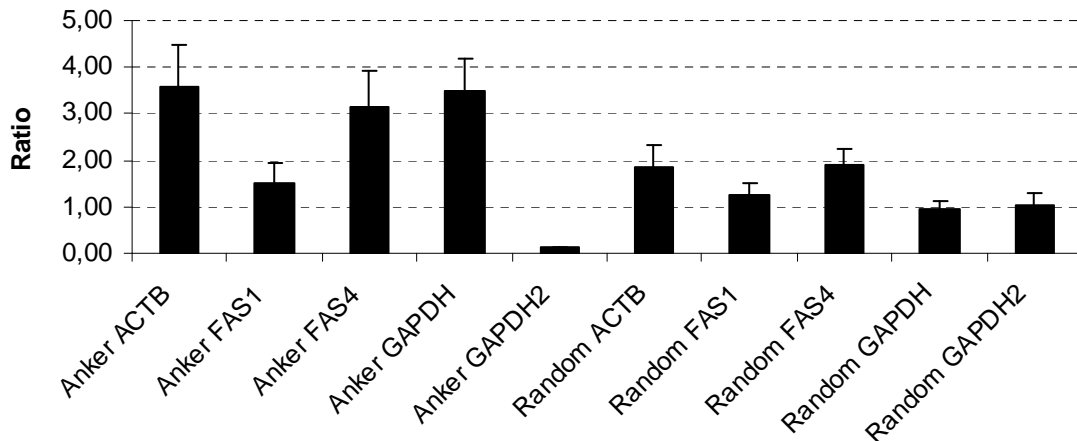
Die Geraden  $x = 24$  und  $y = 3,58$  begrenzen ein Areal in dem sich alle Werte mit einer Leichenliegezeit zwischen 0 und 24 h aufhalten. Die Gerade  $y = 3,58$  fungiert hier als Grenzgerade, das heißt, dass alle Proben mit einem postmortalen Intervall von  $< 24$  h eine Ratio von  $< 3,58$  haben. Während einzelne Proben auch zu späteren Zeitpunkten noch in diesem Bereich lagen, wies die Mehrheit doch eine deutlich stärkere Degradation auf.

Immerhin wäre es auf Grundlage dieser Daten möglich, eine Art Grenzwert bei 24 h zu bilden: Proben mit einer Ratio von größer als 3,58 müssten demnach älter als 24 h sein. Das umgekehrte gilt zwar nicht, allerdings ließe sich bei größerer Datenmenge hierfür evtl. eine Wahrscheinlichkeitsaussage treffen.

Die folgende Darstellung zeigt nun die entsprechenden Grenzwerte für die weiteren unter 4.4. dargestellten Amplifikationen mit den jeweiligen Standardabweichungen.



Abb. 52: Grenzwerte für die Ratios im 24h-Intervall



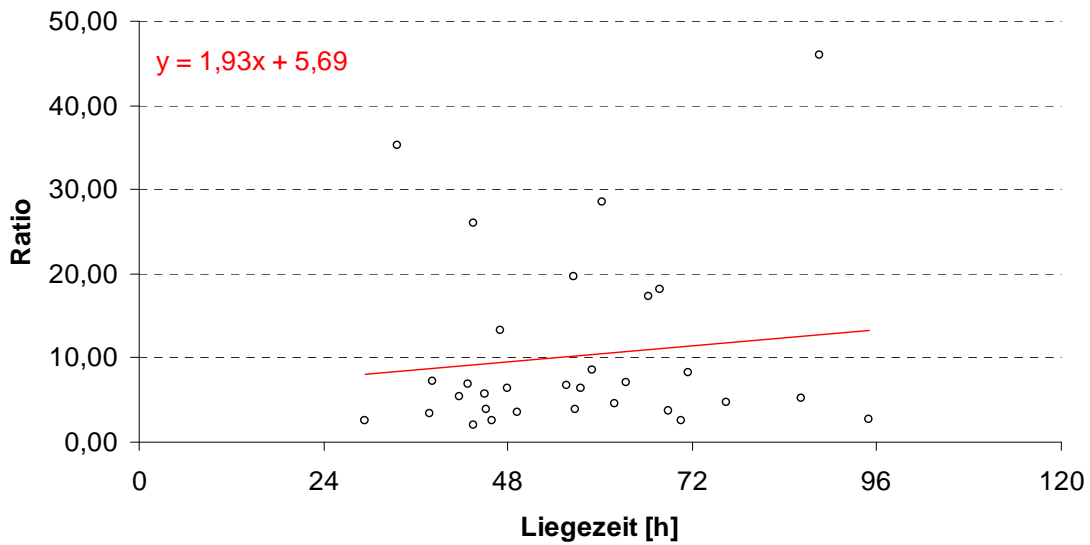
Auch bei Verwendung der weiteren Housekeeping-Gene lässt sich jeweils ein ähnliches Fenster erstellen. Im Falle einer Anker-GAPDH2-Amplifikation lässt es sich sogar auf Werte kleiner 0,13 einengen.

Offensichtlich und das ist diesen Daten zu entnehmen, setzt unter den vorliegenden Umgebungsbedingungen der RNA-Abbau mit einer gewissen, bis zu 24-stündigen Verzögerung ein, was durchaus für Obduktionen zu wissenschaftlichen Zwecken interessant ist.

### 5.3.2. Der Verlauf der RNA-Degeneration nach 24 Stunden

Bei Annahme eines 24-stündigen postmortalen Intervalls ohne größere cerebrale RNA-Degradation stellt sich nun die Frage, ob zu einem späteren Zeitpunkt ein gerichteter Abbau stattfindet. Daher wurden nun ausschließlich diejenigen Werte mit einer Leichenliegezeit größer 24 h und deren Korrelation betrachtet.

Abb. 53: Ratio vs. LLZ bei Anker-ACTB-Priming für Proben mit einer LLZ > 24 h



Der Korrelationskoeffizient für das dargestellte Schaubild (Anker-ACTB-Priming) beträgt  $r = 0,12$ , was gegen eine gerichtete Degradation spricht. Beim Einzeichnen einer linearen Ausgleichsgeraden ergibt sich eine Steigung von  $m = 1,93$ . Dieser Wert spricht zwar für einen stattfindenden Abbau, es kann aber aufgrund der bereiten Streuung von keinem direkten mathematischen Zusammenhang der beiden Werte ausgegangen werden, was eine forensische Nutzbarkeit in Form eines genauen Rückschlusses auf die Leichenliegezeit weitgehend ausschließt.

Die folgende Darstellung zeigt die Korrelationskoeffizienten und Steigungen der linearen Ausgleichsgeraden bei Verwendung der weiteren RT- bzw. Haushaltsgen-Primer.

Abb. 54: Korrelation und Steigung der Ausgleichsgeraden für Proben mit einer LLZ > 24 h

Primer	Korrelationskoeffizient r	Steigung m
Anker ACTB	0,12	1,93
Anker FASN1	0,17	1,82
Anker FASN4	-0,22	-1,86
Anker GAPDH	0,32	4,28
Anker GAPDH2	-0,01	-0,05
Random ACTB	0,29	2,83

Random FASN1	0,10	1,13
Random FASN4	0,12	1,22
Random GAPDH	-0,05	-0,49
Random GAPDH2	0,19	1,48

Im Mittel ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,10$  sowie eine Steigung von  $m = 1,23$ . Die Ergebnisse der verschiedenen Primer bestätigen die Schlussfolgerungen, die aus Abb. 53 (Anker-ACTB-Priming) gezogen werden konnten. Auch die negativen Korrelationskoeffizienten bzw. Steigungswerte bestätigen die große Streuung und mindern die Annahme einer gerichteten Degradation.

### 5.3.3. RNA-Degradation in anderen Geweben bzw. anderer Gene

Somit konnte in dieser Arbeit eine direkte Korrelation in Form einer linearen oder exponentiellen Degradation ebenfalls nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich der RNA-Abbau mit einer 24-stündigen Latenz. Eine gewisse postmortale Stabilität wurde ja bereits von Harrison et al 1995 bezüglich des Gesamt-RNA-Gehaltes beschrieben und ebenso von Johnson et al bereits 1986. Die hier vorgestellten Arbeiten, einschließlich der hier beschriebenen, bezogen sich jedoch auf die Degradation verschiedener Haushaltsgene, die primär als ubiquitär exprimiert und frei von äußeren Einflüssen gesehen werden. Daher wäre eine gezielte Degradation durchaus denkbar gewesen. Auch nach dem 24-Stunden-Intervall konnte in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine nun stattfindende gerichtete Degradation gefunden werden.

Betrachtet man das postmortale Verhalten anderer Gene, so wird beispielsweise die mRNA des Hitzeschock-Proteins 70 innerhalb der ersten 24 Stunden bereits stark degradiert bzw. abgebaut (Pardue et al 1994). Ein weiteres differierendes Verhalten zeigt die 3H-Cytidine-mRNA, die bei zu Lebzeiten zugefügten Verletzungen in der basalen Zellschicht der Haut vermehrt hergestellt wird und deren Synthese auch postmortal noch anhält (Oehmichen et al 1997). Somit scheint das postmortale Verhalten der verschiedenen mRNAs auch von deren Funktion im Organismus bzw. im jeweiligen Organ abhängig zu sein. Neuere Studien gehen nun auch Hinweisen

nach, die eine Abhängigkeit von bestimmten Nukleotidsequenzen vermuten lassen. So scheinen mRNAs, die ein AUUUA-Motiv im nicht translatierten Bereich des 3'-Endes tragen, einer vom postmortalen Intervall abhängigen Degradation zu unterliegen (Catts et al 2005).

### **5.3.4. Ausblick und Bedeutung**

Von einem einheitlichen RNA-Abbau kann mit dem aktuellen Wissensstand nicht mehr ausgegangen werden, womit noch viele Fragen ungeklärt verbleiben und neue aufgeworfen werden.

Im Falle der Haushaltsgen-mRNA in postmortalem cerebralem Gewebe lässt sich jedoch die hier gezeigte 24-stündige Degradations-Latenz in jedem Fall für Genexpressionsstudien nutzen, da in diesem Zeitraum die zu Lebzeiten vorherrschende Haushaltsgen-Expression bestehen bleibt. Somit kann diese Arbeit zum Ausgangspunkt für Ursachenforschung bei neurologischen oder neuropsychiatrischen Erkrankungen werden, bei denen eine differente Expression von Haushaltsgenen als Ätiologie in Betracht gezogen wird.

Im forensischen Arbeitsbereich kann beim Vorliegen spezieller Fragestellungen und einer den Grenzwert deutlich überschreitenden Ratio eine Leichenliegezeit von > 24 Stunden angenommen werden. Bei der generellen Bestimmung des postmortalen Intervalls bleiben jedoch die aktuell geläufigen und in der Einleitung vorgestellten Methoden überlegen.

### **5.4. Zusammenfassung**

Bei der Isolation von RNA aus cerebralem Gewebe wurde ersichtlich, dass Proben aus dem Markbereich den aus der Hirnrinde gewonnenen Anteilen in ihrem RNA-Gehalt stets unterlegen waren. Alle weiteren Versuche wurden deshalb mit den Proben aus dem Rindenbereich durchgeführt. Zur Validierung der Reinheit und Inhaltes wurden alle Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt sowie einer Überprüfung auf eventuell vorhandene DNA unterzogen. Auf die Verwendung einer DNase wurde verzichtet, da zum einen in den oben

genannten Amplifikationen keine DNA nachgewiesen werden konnte, zum anderen lieferten RNA-Amplifikationen bei Verwendung einer DNase sehr schlechte Ergebnisse, so dass eine zusätzliche RNA-Zerstörung in Betracht gezogen werden muss. Weiter hat sich gezeigt, dass bei strenger Standardisierung und konsequenter Elimination von möglichen Artefakten eine zuverlässige Quantifizierung verschiedener Haushaltsgen-mRNAs auch nach reverser Transkription möglich ist, was durch Verdünnungsreihen und die Bestimmung der PCR-Effizienz nachgewiesen werden konnte. Zwar spielt die Wahl der Transkriptionsprimer (Anker, Random und Oligo dT) keine Rolle und lässt sich auch nicht forensisch nutzen; die laubereinigte mRNA- bzw. cDNA-Menge einer Probe weist jedoch sehr wohl Bezüge zur Leichenliegezeit auf. Bei Auftragung der Realtime-PCR-Ratio gegen die Leichenliegezeit ergab sich kein linearer oder exponentieller Zusammenhang, jedoch fanden sich bei postmortalen Intervallen unter 24 Stunden stets sehr kleine Ratios, was für keine bzw. sehr wenig RNA-Degradation spricht. Für alle Haushaltsgen-mRNAs konnte so ein jeweiliger Grenzwert festgelegt werden, unter dem alle Werte im 24-Stunden-Intervall liegen. Bei alleiniger Betrachtung von Proben mit einer Leichenliegezeit über 24 Stunden kann zwar insgesamt von einer Degradation ausgegangen werden, jedoch findet sich auch hier kein linearer oder exponentieller Zusammenhang. Bei unbekannter Leichenliegezeit und einer Ratio, die den jeweiligen Grenzwert überschreitet, kann nach Anwendung der genannten Ergebnisse auf ein postmortales Intervall über 24 Stunden geschlossen werden. Befindet sich die Ratio unterhalb dieses Grenzwertes kann jedoch keine Aussage getroffen werden. Auch wenn so eine Nutzung der Methode nach Art von Perzentilen nicht möglich erscheint, so könnte doch die Angabe von klaren Grenzwerten, wie sie sich hier andeutet, forensisch nutzbar sein.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ABI Prism 7000 SDS Software
- 2 Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2004) Molekularbiologie der Zelle, Wiley-VCH
- 3 Amendt J, Zehner R, Bratzke H (2003) Forensische Insektenkunde: Ein aktueller Forschungszweig der Rechtsmedizin. Dtsch Arztebl 100: A 3382–3385 [Heft 51–52]
- 4 Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 11;21(3):389-95
- 5 Barrachina M, Castano E, Ferrer I (2006) TaqMan PCR assay in the control of RNA normalization in human post-mortem brain tissue. *Neurochem Int.* 49(3):276-84
- 6 Barton AJ, Pearson RC, Najlerahim A, Harrison PJ (1993) Pre- and postmortem influences on brain RNA. *J Neurochem* 61(1):1-11
- 7 Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML (2004) Utility of housekeeping genes 18S rRNA, beta actin and glycerolaldehyd-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 59(6):566-73
- 8 Bauer M (2004) Molekularbiologische Untersuchungen zur simultanen Bestimmung von Art, Herkunft, Alter und Individualmerkmalen forensisch-biologischer Spuren. Habilitationsschrift, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 9 Bauer M, Gramlich I, Polzin S, Patzelt D (2003) Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval - a pilot study. *Leg Med (Tokyo)* 5(4):220-7
- 10 Bauer M, Polzin S, Patzelt D (2003) Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Science International* 138:94-103

- 11 Benecke M (1998) Rechtsmedizinisch angewandte kerb- und spinnentierkundliche Begutachtungen in Europa. Rechtsmedizin 8:153-155
- 12 Biochemisches Praktikum für Studierende der Medizin und Zahnmedizin an der Universität Würzburg 2003
- 13 Catts VS, Catts SV, Fernandez HR, Taylor JM, Coulson EJ, Lutze-Mann LH (2005) A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue. Brain Res Mol Brain Res. 138(2):164-77
- 14 Chirgwin JM, Przybyla AE, Mac Donald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18(24):5294-9
- 15 Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry 162,156-159
- 16 Danielson PE, Forss-Petter S, Brow MA, Calavetta L, Douglass J, Milner RJ, Sutcliffe JG (1988) p1B15: a clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. DNA 7(4):261-7
- 17 Davidson JN (1976) The biochemistry of the nucleic acids. Chapman and Hall, London
- 18 Eberhard M (2002) Computertomographie in der Mumienforschung. Diplomarbeit am Krankenhaus der Stadt Wien - Lainz
- 19 Eckl M (2004) Temperaturgestützte Todeszeitschätzung bei nur partiell bekannten Umgebungsbedingungen. Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
- 20 Finger JM, Mercer JF, Cotton RG, Danks DM (1987) Stability of protein and mRNA in human postmortem liver--analysis by two-dimensional gel electrophoresis. Clin Chim Acta 170(2-3): 209-18
- 21 Harrison PJ, Heath PR, Eastwood SL, Burnet PW, McDonald B, Pearson RC (1995) The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. Neurosci Lett 200(3):151-4

- 22 Heinrich M, Matt K, Lutz-Bonengel S, Schmidt U (2007) Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med* 121(2):136-42
- 23 Humphreys-Beher MG, King FK, Bunnel B, Brody B (1986) Isolation of biologically active RNA from human autopsy for the study of cystic fibrosis. *Biotechnol Appl Biochem* 8(5):392-403
- 24 Inoue H, Kimura A, Tuji T (2002) Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci Int* 130(2-3):127-32
- 25 Johnson SA, Morgan DG, Finch CE (1986) Extensive postmortem stability of RNA from rat and human brain. *J Neurosci Res* 16(1):267-80
- 26 Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Findlay DM (2005) Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-mortem and surgery. *Biochim Biophys Acta* 1740(1):1-11
- 27 Lee J, Hever A, Willhite D, Zlotnik A, Hevezi P (2005) Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj.04-3552fje.
- 28 Leonard S, Logel J, Luthman D, Casanova M, Kirch D, Freedman R (1993) Biological stability of mRNA isolated from human postmortem brain collections. *Biol Psychiatry* 33(6):456-66
- 29 Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, Tomita H, Evans SJ, Choudary PV, Lopez JF, Avelar A, Shokoohi V, Chung T, Mesarwi O, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney WE Jr, Myers RM (2004) Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum Mol Genet* 13(6):609-16
- 30 Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402-408
- 31 Lu JY, Schneider RJ (2004) Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay. *J Biol Chem* 279(13):12974-9
- 32 Madea (2003) *Praxis Rechtsmedizin*, Springer Verlag



- 33 Malik KJ, Chen CD, Olsen TW (2003) Stability of RNA from the retina and retinal pigment epithelium in a porcine model simulating human eye bank conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(6):2730-5
- 34 Miller CL, Diglisic S, Leister F, Webster M, Yolken RH (2004) Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of postmortem human brain tissue. *Biotechniques* 36(4):628-33
- 35 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73
- 36 Mund M, Bär W (2005) Rechtsmedizinische Aspekte beim plötzlichen Todesfall. *Schweiz Med Forum* 5:129–135
- 37 Neusser M (2000) Echtzeit-PCR-Verfahren zur Quantifizierung von PCR-Produkten. *Sonderdruck-transkript/LABORWELT* 2/00
- 38 Oehmichen M, Lagodka T, Cropelin A (1997) RNA and DNA synthesis of epidermal basal cells after wounding. Comparison of vital and postmortem investigations. *Exp Toxicol Pathol* 49(3-4):233-7
- 39 Pardue S, Zimmerman AL, Morrison-Bogorad M (1994) Selective postmortem degradation of inducible heat shock protein 70 (hsp70) mRNAs in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 14(4):341-57
- 40 Perrett CW, Marchbanks RM, Whatley SA (1988) Characterisation of messenger RNA extracted post-mortem from the brains of schizophrenic, depressed and control subjects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51(3):325-31
- 41 Pfaffl M (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1(10):92-5
- 42 Pfaffl M, Hageleit M (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in rela-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 23:275-282
- 43 Phang TW, Shi CY, Chia JN, Ong CN (1994) Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues. *J Forensic Sci* 39(5):1275-9

- 44 Preece P, Cairns NJ (2003) Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Brain Res Mol Brain Res* 118(1-2):60-71
- 45 Rutledge RG, Cote C (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* Vol.31, No 16 e93
- 46 Schelhorn J (2004) Die Nicotinamid-, Thymin- und Uracilkonzentration im Leichenblut. Doktorarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 47 Skrypina NA, Timofeeva AV, Khaspekov GL, Savochkina LP, Beabealashvili RSh (2003) Total RNA suitable for molecular biology analysis. *J Biotechnol* 105(1-2):1-9
- 48 Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcuca K, Hatanpaa KJ, Tamminga CA (2006) Human postmortem tissue, what quality markers matter? *Brain Res* 1123(1):1-11
- 49 Stordeur P, Zhou L, Goldman M (2002) Analysis of spontaneous mRNA cytokine production in peripheral blood. *J Immunol Methods* 261(1-2):195-7
- 50 Stryer, Lubert (2003) *Biochemie*, Spectrum Verlag
- 51 Takahashi N, Hayano T, Suzuki M (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*. 337(6206):473-5.
- 52 Temin HM (1985): Reverse transcription in the eukaryotic genome: retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons, and retrotranscripts. *Mol Biol Evol* 2(6):455-68
- 53 Ullmannova V, Haskovec C (2003) The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. *Folia Biol (Praha)* 49(6):211-6
- 54 Wakil SJ (1989) Fatty Acid Synthase, a proficient multifunctional enzyme? *Biochemistry* Vol. 28 No 11
- 55 Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Annals of Internal Medicine* 138(7):581-2

- 56 Wiedemann C, Schulz HL, Weber BHF (2004) Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum* 1(10):99-102
- 57 Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL (2001) High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Brain Res Brain Res Protoc* 8(3):212-8

## 7. ANHANG

7.1 Leichendaten

Nr.	ID-Nr.	♀/♂	<u>Rinde/Mark</u>	Alter [a]	LLZ [h]	Todeszeitpunkt
1/2	126/04	♀	R/M	61	41	28.04.04 14:30 Uhr
3/4	127/04	♂	R/M	59	43	28.04.04 14:30 Uhr
5/6	124/04	♂	R/M	42	57	26.04.04 00:00 Uhr
7/8	133/04	♀	R/M	44	45	03.05.04 12:00 Uhr
9/10	140/04	♂	R/M	76	31	16.05.04 02:45 Uhr
11/12	146/04	♂	R/M	51	24	24.05.04 08:30 Uhr
13/14	145/04	♀	R/M	50	94	20.05.04 11:00 Uhr
15/16	148/04	♂	R/M	37	66	29.05.04 18:45 Uhr
17/18	144/04	♀	R/M	71	68	18.05.04 12:36 Uhr
19/20	165/04	♀	R/M	49	63	19.06.04 19:25 Uhr
21/22	125/04	♀	R/M	51	13	27.04.04 22:00 Uhr
23/24	134/04	♂	R/M	38	45	03.05.04 14:45 Uhr
25/26	197/04	♀	R/M	45	11	24.07.04 00:00 Uhr
27/28	141/04	♀	R/M	0,5	15	16.05.04 16:56 Uhr
29/30	132/04	♂	R/M	41	56	01.05.04 23:40 Uhr
31/32	190/04	♂	R/M	38	14	14.07.04 22:30 Uhr
33/34	189/04	♂	R/M	76	59	13.07.04 00:00 Uhr
35/36	185/04	♂	R/M	45	86	09.07.04 18:20 Uhr
37/38	175/04	♀	R/M	17	24	04.07.04 09:00 Uhr
39/40	206/04	♂	R/M	29	42	28.07.04 15:45 Uhr
41/42	207/04	♂	R/M	27	71	30.07.04 09:00 Uhr
43/44	215/04	♂	R/M	17	38	03.08.04 18:45 Uhr
45/46	192/04	♂	R/M	19	48	17.07.04 10:00 Uhr
47/48	221/04	♀	R/M	87	88	07.08.04 18:30 Uhr
49/50	229/04	♂	R/M	25	37	16.08.04 21:05 Uhr
51/52	181/04	♂	R/M	52	62	11.07.04 18:30 Uhr
53/54	210/04	♂	R/M	57	55	01.08.04 04:15 Uhr
55/56	211/04	♂	R/M	77	60	31.07.04 20:43 Uhr
57/58	225/04	♂	R/M	22	49	15.08.04 08:40 Uhr
59/60	174/04	♂	R/M	76	46	03.07.04 13:00 Uhr
61/62	198/04	♂	R/M	48	43	24.07.04 14:30 Uhr
63/64	228/04	♂	R/M	57	76	15.08.04 05:00 Uhr
65/66	214/04	♂	R/M	43	29	03.08.04 05:06 Uhr
67/68	226/04	♂	R/M	33	82	12.08.04 22:10 Uhr
69/70	187/04	♂	R/M	48	18	12.07.04 16:10 Uhr

## 7. Anhang

71/72	220/04	♀	R/M	44	33	08.08.04 23:50 Uhr
73/74	257/04	♂	R/M	37	12	19.09.04 21:30 Uhr
75/76	258/04	♂	R/M	61	95	17.09.04 10:30 Uhr
77/78	302/03	♂	R/M	23	10	16.10.03 00:09 Uhr
79/80	349/03	♀	R/M	78	47	29.11.03 11:00 Uhr
81/82	315/03	♀	R/M	68	68	25.10.03 12:40 Uhr
83/84	37/00	♀	R/M	63	67	12.02.00 12:37 Uhr
85/86	307/03	♀	R/M	39	7	21.10.03 04:10 Uhr
87/88	330/00	♂	R/M	86	70	09.11.00 12:00 Uhr
89/90	94/97	♀	R/M	57	56	31.03.97 01:55 Uhr

Nr.	Sektionszeitpunkt	Körpergröße [cm]	Körpergewicht [kg]	BMI
1/2	30.04.04 08:15 Uhr	170	75	25,95
3/4	30.04.04 10:00 Uhr	185	102	29,80
5/6	28.04.04 09:30 Uhr	171	95	32,49
7/8	05.05.04 09:00 Uhr	167	86	30,84
9/10	17.05.04 10:30 Uhr	181	79	24,11
11/12	25.05.04 09:00 Uhr	180	95	29,32
13/14	24.05.04 09:30 Uhr	165	60	22,04
15/16	01.06.04 13:00 Uhr	198	122	31,12
17/18	21.05.04 09:00 Uhr	152	65	28,13
19/20	22.06.04 10:45 Uhr	170	93	32,18
21/22	28.04.04 11:00 Uhr	170	90	31,14
23/24	05.05.04 12:00 Uhr	175	75	24,49
25/26	24.07.04 11:30 Uhr	164	55	20,45
27/28	17.05.04 08:30 Uhr	68	7,1	15,35
29/30	04.05.04 08:30 Uhr	189	85	23,80
31/32	15.07.04 12:30 Uhr	184	81	23,92
33/34	15.07.04 11:00 Uhr	173	62	20,72
35/36	13.07.04 08:30 Uhr	173	124	41,43
37/38	05.07.04 09:30 Uhr	175	66	21,55
39/40	30.07.04 10:30 Uhr	180	75	23,15
41/42	02.08.04 08:30 Uhr	190	84	23,27
43/44	05.08.04 09:00 Uhr	180	65	20,06
45/46	19.07.04 10:00 Uhr	186	69	19,94
47/48	11.08.04 11:00 Uhr	150	35	15,56
49/50	18.08.04 11:00 Uhr	180	75	23,15
51/52	14.07.04 08:30 Uhr	175	123	40,16
53/54	03.08.04 12:00 Uhr	165	60	22,04
55/56	03.08.04 09:00 Uhr	175	80	26,12

## 7. Anhang

57/58	17.08.04 10:00 Uhr	180	78	24,07
59/60	05.07.04 11:00 Uhr	186	88	25,44
61/62	26.07.04 10:00 Uhr	170	53	18,34
63/64	18.08.04 09:30 Uhr	176	80	25,83
65/66	04.08.04 10:30 Uhr	178	92	29,04
67/68	16.08.04 08:30 Uhr	178	90	28,41
69/70	13.07.04 10:30 Uhr	189	84	23,52
71/72	10.08.04 09:30 Uhr	169	75	26,26
73/74	20.09.04 10:00 Uhr	180	80	24,69
75/76	21.09.04 09:30 Uhr	184	85	25,11
77/78	16.10.03 10:30 Uhr	173	77	25,73
79/80	01.12.03 10:00 Uhr	168	87	30,82
81/82	28.10.03 09:30 Uhr	166	-	-
83/84	15.02.00 08:30 Uhr	157	58	23,53
85/86	21.10.03 12:00 Uhr	174	146,5	48,39
87/88	12.11.00 10:30 Uhr	146	30	14,07
89/90	02.04.97 10:30 Uhr	174	85	28,08

<b>Nr.</b>	<b>Gehirngewicht [g]</b>	<b>Kopfverletzungen</b>
1/2	1330	-
3/4	1400	-
5/6	1540	-
7/8	1310	-
9/10	1260	-
11/12	1630	-
13/14	1040	stumpfe Gewalteinwirkung re Hinterkopf
15/16	1670	-
17/18	1040	-
19/20	1270	-
21/22	1080	-
23/24	1440	-
25/26	1280	-
27/28	790	-
29/30	1465	-
31/32	1530	-
33/34	1480	-
35/36	1710	Teilablösung der Kopfschwarte
37/38	1310	-
39/40	1510	quergestellte Verletzung am Hinterkopf
41/42	1520	-

43/44	1450	-
45/46	1480	-
47/48	1000	-
49/50	-	trümmerartige Frakturen
51/52	1440	-
53/54	1400	-
55/56	1250	-
57/58	1510	Schädelbasisringbruch
59/60	1350	-
61/62	1220	-
63/64	1200	-
65/66	1340	-
67/68	1470	-
69/70	1470	Rißwunde über der Augenbraue
71/72	1400	-
73/74	1420	-
75/76	1440	-
77/78	1300	-
79/80	1200	-
81/82	1250	Schäeldachlücke (Durchmesser 11,5cm)
83/84	1220	Schädelbasis- und Schäeldachfraktur
85/86	1430	-
87/88	1180	-
89/90	1065	Schädelbasis- und Schäeldachfraktur

Nr.	Alkohol (Blut) [‰]	Alkohol (Urin) [‰]
1/2	1,48	2,18
3/4	0,17	0,33
5/6	-	-
7/8	0,48	0,55
9/10	-	-
11/12	-	-
13/14	-	-
15/16	-	-
17/18	-	-
19/20	-	-
21/22	-	-
23/24	-	-
25/26	1,63	2,66
27/28	-	-

29/30	0,01	0,05
31/32	0,02	0,02
33/34	0,03	0,06
35/36	-	-
37/38	0,01	0,01
39/40	-	-
41/42	-	-
43/44	-	-
45/46	0,01	0,1
47/48	-	-
49/50	0,11	-
51/52	-	-
53/54	2,89	4,36
55/56	-	-
57/58	-	-
59/60	-	-
61/62	0,01	-
63/64	-	-
65/66	-	-
67/68	0,07	-
69/70	0,99	3,22
71/72	-	-
73/74	0	0,01
75/76	-	-
77/78	0	0
79/80	0	-
81/82	-	-
83/84	0,06	-
85/86	0	-
87/88	-	-
89/90	1,1	-

<b>Nr.</b>	<b>Medikamente/ Drogen</b>
1/2	Nitrazepam, Fentanyl, Alfentanyl, Ibuprofen
3/4	Fentanyl, Alfentanyl, Nitrazepam-Metabolit
5/6	-
7/8	Clozapin, Norclozapin, Temazepam
9/10	-
11/12	-
13/14	-



15/16	-
17/18	-
19/20	-
21/22	-
23/24	-
25/26	Bromazepam
27/28	-
29/30	Morphin, Codein, Methadon, Diazepam, Nordiazepam
31/32	-
33/34	Trimipramin
35/36	-
37/38	Amitriptylin
39/40	-
41/42	-
43/44	THC-COOH
45/46	Trimipramin, Codein
47/48	-
49/50	-
51/52	-
53/54	-
55/56	-
57/58	-
59/60	-
61/62	-
63/64	-
65/66	-
67/68	-
69/70	-
71/72	-
73/74	-
75/76	-
77/78	-
79/80	-
81/82	-
83/84	-
85/86	-
87/88	-
89/90	-

Nr.	Todesursache
1/2	Medikamentenintoxikation: Suxamethoniumchlorid
3/4	Ertrinken als Folge von Medikamentenintoxikation
5/6	Hirnblutung infolge Hirnbasisaneurysma
7/8	Medikamentenintoxikation
9/10	Rechtsherzversagen bei rez. Lungenembolien
11/12	Einriss der Brustschlagader mit Herzbeutelamponade
13/14	Einblutungen unter die harte und weiche Hirnhaut
15/16	rechtsbetontes Pumpversagen bei Herzmuskelmassenzunahme
17/18	Multiorganversagen nach intraoperativem Blutverlust
19/20	Wiederholte Herzinfarkte
21/22	erhöhte Blutungsneigung
23/24	Wiederholte Herzinfarkte
25/26	Strangulation
27/28	unklar
29/30	Drogen- und Medikamentenintoxikation
31/32	Herzinfarkt
33/34	Intoxikation: Trimipramin
35/36	Mehrfachverletzung: Schädel, Brustkorb und Wirbelsäule
37/38	Arzneimittelintoxikation
39/40	offenes Schädel-Hirn-Trauma
41/42	Einriss der Brustschlagader aus krankhafter Ursache
43/44	Ertrinken
45/46	Drogen- / Medikamentenintoxikation
47/48	Herzinfarkt
49/50	Offenes Schädel-Hirn-Trauma mit Enthirnung
51/52	plötzlicher Herztod
53/54	Herzversagen bei Herzvorschädigung
55/56	mehrfaches Organversagen bei schwerer Herzvorschädigung
57/58	Polytrauma
59/60	HWS-Durchschuss
61/62	akutes Herzversagen
63/64	akutes Herzversagen
65/66	Wiederholte Herzinfarkte
67/68	Mehrfachorganversagen unbekannter Ursache
69/70	Sturzbedingtes Schädel-Hirn-Trauma dazu starker Blutverlust und Unterkühlung
71/72	Ersticken auf dem Boden einer massiven Thoraxkompression
73/74	Abriss der Körperhautschlagader mit Verbluten nach innen
75/76	Riss einer großen Aussackung der unteren Bauchschlagader mit Verbluten nach innen

77/78	Verbluten nach innen bei Leberzertrümmerung
79/80	Schädel-Hirn-Trauma und Subduralhämatom
81/82	Lungenpropfembolie bei Z.n. Schädelbasis- und Schädeldachfraktur
83/84	Hirnblutungen
85/86	Multiple Stichverletzungen
87/88	chronische Pumpschwäche
89/90	Schädelbasis- und Schädeldachfraktur

### **7.2 RNA-Isolationsdaten**

<b>Nr.</b>	<b><u>Rinde/Mark</u></b>	<b>Hirngewicht [g]</b>	<b>Denat. Solution</b>	<b>Inhalt [ng/μl]</b>	<b>500ng [μl]</b>
1	R	0,1189	1,43	739,6	0,68
3	R	0,1733	2,08	783,9	0,64
5	R	0,1114	1,34	1108,9	0,45
7	R	0,1066	1,28	622	0,80
9	R	0,1247	1,50	1128,9	0,44
11	R	0,0996	1,20	1248	0,40
13	R	0,1425	1,71	416,8	1,20
15	R	0,1509	1,81	758,7	0,66
17	R	0,1452	1,74	691,9	0,72
19	R	0,1344	1,61	1147,8	0,44
21	R	0,1303	1,56	521	0,96
23	R	0,1045	1,25	722,7	0,69
25	R	0,1292	1,55	747,7	0,67
27	R	0,1168	1,40	898,5	0,56
29	R	0,1148	1,38	612,5	0,82
31	R	0,1439	1,73	549,3	0,91
33	R	0,1276	1,53	588,7	0,85
35	R	0,1340	1,61	829,6	0,60
37	R	0,1183	1,42	707,1	0,71
39	R	0,1533	1,84	522,3	0,96
41	R	0,1415	1,70	539	0,93
43	R	0,1496	1,80	489,4	1,02
45	R	0,1418	1,70	598,9	0,83
47	R	0,1394	1,67	629,9	0,79
49	R	0,1253	1,50	856,3	0,58
51	R	0,1190	1,43	795,5	0,63
53	R	0,1520	1,82	626,2	0,80
55	R	0,1384	1,66	605,6	0,83

## 7. Anhang

57	R	0,1151	1,38	703,9	0,71
59	R	0,1432	1,72	647,5	0,77
61	R	0,1206	1,45	713,6	0,70
63	R	0,1209	1,45	502,5	1,00
65	R	0,1164	1,40	492,9	1,01
67	R	0,1492	1,79	312	1,60
69	R	0,1266	1,52	594,3	0,84
71	R	0,1301	1,56	868,8	0,58
73	R	0,1582	1,90	525,6	0,95
75	R	0,1290	1,55	712,5	0,70
77	R	0,1347	1,62	477,1	1,05
79	R	0,1642	1,97	835	0,60
81	R	0,1317	1,58	752	0,66
83	R	0,1179	1,41	239,3	2,09
85	R	0,0961	1,15	700,8	0,71
87	R	0,1211	1,45	1098,7	0,46
89	R	0,1501	1,80	1410,2	0,35

Nr.	Rinde/Mark	Hirngewicht [g]	Denat. Solution	Inhalt [ng/µl]	500ng [µl]
2	M	0,1314	1,58	273,7	1,83
4	M	0,1364	1,64	582,7	0,86
6	M	0,0954	1,14	335,3	1,49
8	M	0,1271	1,53	110,3	4,53
10	M	0,1239	1,49	384,6	1,30
12	M	0,0955	1,15	302,7	1,65
14	M	0,1206	1,45	592,1	0,84
16	M	0,1375	1,65	397,5	1,26
18	M	0,1233	1,48	422,4	1,18
20	M	0,1037	1,24	318,8	1,57
22	M	0,1347	1,62	306,5	1,63
24	M	0,1099	1,32	372,9	1,34
26	M	0,1408	1,69	479,2	1,04
28	M	0,1164	1,40	837,7	0,60
30	M	0,1467	1,76	412,9	1,21
32	M	0,1211	1,45	508,8	0,98
34	M	0,1204	1,44	646,3	0,77
36	M	0,1330	1,60	557,2	0,90
38	M	0,1107	1,33	416,5	1,20
40	M	0,1273	1,53	193,4	2,59
42	M	0,1213	1,46	343,5	1,46

## 7. Anhang

---

44	M	0,1559	1,87	314,6	1,59
46	M	0,1362	1,63	299,4	1,67
48	M	0,1125	1,35	413,7	1,21
50	M	0,1633	1,96	357,4	1,40
52	M	0,1110	1,33	371,6	1,35
54	M	0,1530	1,84	318,7	1,57
56	M	0,1173	1,41	349,4	1,43
58	M	0,1349	1,62	347,2	1,44
60	M	0,1540	1,85	397,2	1,26
62	M	0,1172	1,41	512,8	0,98
64	M	0,1132	1,36	284,1	1,76
66	M	0,1022	1,23	468,5	1,07
68	M	0,1130	1,36	100,6	4,97
70	M	0,1315	1,58	355,7	1,41
72	M	0,1307	1,57	487,4	1,03
74	M	0,1106	1,33	749,6	0,67
76	M	0,1151	1,38	473,1	1,06
78	M	0,0956	1,15	306,2	1,63
80	M	0,1058	1,27	363,1	1,38
82	M	0,1205	1,45	376,5	1,33
84	M	0,1349	1,62	428,6	1,17
86	M	0,1186	1,42	669	0,75
88	M	0,1061	1,27	653,9	0,76
90	M	0,1388	1,67	286,2	1,75

### **7.3. Realtime-PCR-Ergebniswerte**

<b>Nr.</b>	<b>cyccomp1</b>	<b>cyccomp2</b>	<b>cyccomp3</b>	<b>Mw cyccomp</b>
1	23,19	23,26	14,46	23,23
3	23,23	23,32	23,47	23,34
5	23,10	12,20	16,80	17,37
7	23,02	23,06	22,83	22,97
9	11,12	11,68	13,00	11,93
11	15,68	23,75	22,54	20,66
13	22,89	22,71	22,81	22,80
15	13,76	13,55	23,20	13,66
17	22,93	22,58	22,76	22,85
19	10,01	10,00	9,21	10,01
21	22,93	23,07	24,02	23,00

23	13,07	22,75	11,40	15,74
25	5,38	8,49	9,12	7,66
27	22,44	22,59	22,42	22,48
29	22,77	22,87	22,31	22,82
31	15,26	15,28	13,97	15,27
33	22,77	22,47	22,65	22,63
35	15,56	13,66	13,30	14,17
37	22,66	22,76	22,63	22,68
39	23,05	23,24	23,64	23,15
41	23,20	22,79	22,74	22,77
43	23,14	22,87	22,87	22,96
45	22,96	23,00	23,11	23,02
47	22,73	22,54	22,66	22,64
49	23,12	22,56	22,84	22,84
51	22,91	22,90	22,67	22,83
53	22,79	22,59	22,76	22,71
55	20,55	22,96	22,98	22,97
57	23,07	23,56	24,28	23,64
59	18,05	22,62	22,57	22,60
61	9,14	8,61	9,44	9,29
63	23,17	22,56	22,73	22,65
65	22,52	22,51	22,52	22,52
67	22,37	22,33	22,43	22,38
69	23,01	22,85	22,48	22,93
71	22,63	22,45	22,37	22,48
73	22,99	10,95	12,81	15,58
75	23,06	22,01	23,43	22,83
77	22,58	22,72	22,78	22,69
79	22,64	22,81	22,65	22,70
81	22,64	22,82	22,65	22,70
83	23,02	22,9	22,95	22,96
85	22,86	23,17	22,67	22,77
87	22,91	6,82	23,07	22,99
89	22,78	22,58	23,11	22,68

7. Anhang

<b>Nr.</b>	<b>cycwild1</b>	<b>cycwild2</b>	<b>cycwild3</b>	<b>Mw cycwild</b>	<b>comp-wild</b>	<b>CT DNA</b>
1	20,93	20,69	20,47	20,58	2,65	35,35
3	19,34	18,73	19,37	19,36	3,99	36,11
5	20,48	13,62	17,69	17,26	0,10	36,05
7	20,23	20,35	20,36	20,31	2,66	Undetermined
9	7,27	10,08	11,24	9,53	2,40	39,09
11	11,98	21,01	16,65	16,55	4,11	38,38
13	22,63	22,59	22,49	22,57	0,23	30,34
15	21,11	13,38	14,50	16,33	-2,68	30,72
17	22,35	22,28	22,33	22,32	0,52	30,11
19	11,18	11,39	12,53	11,29	-1,28	30,10
21	20,81	20,73	21,04	20,77	2,23	28,82
23	11,13	9,59	14,02	11,58	4,16	29,20
25	9,28	8,36	8,62	8,49	-0,83	29,15
27	20,29	20,38	20,33	20,33	2,15	27,44
29	19,76	18,35	20,12	19,41	3,41	28,05
31	17,79	14,08	12,60	14,82	0,45	29,49
33	20,96	20,98	20,88	20,94	1,69	29,94
35	12,13	15,68	11,98	12,06	2,12	33,75
37	22,45	22,45	22,51	22,47	0,21	30,00
39	20,53	20,46	20,43	20,47	2,67	30,10
41	20,87	21,00	20,93	20,93	1,83	29,72
43	20,55	20,52	20,83	20,54	2,43	28,39
45	20,19	20,45	15,46	20,32	2,70	28,74
47	22,10	21,94	22,01	22,02	0,63	29,46
49	18,89	20,33	20,32	20,33	2,52	28,89
51	20,18	20,58	20,10	20,14	2,69	27,84
53	20,71	20,62	20,89	20,74	1,97	29,07
55	21,78	21,56	21,64	21,66	1,31	29,42
57	19,77	19,74	19,87	19,79	3,84	29,60
59	15,27	13,74	17,50	15,50	7,09	29,55
61	11,57	9,82	9,76	9,79	-0,50	28,68
63	20,45	20,42	20,73	20,44	2,21	Undetermined
65	20,01	19,44	20,10	20,06	2,46	36,01
67	22,07	22,04	22,14	22,08	0,29	29,71
69	19,62	19,87	17,72	19,75	3,19	35,52
71	21,27	21,14	21,15	21,19	1,30	Undetermined
73	19,83	10,56	14,32	14,90	0,68	Undetermined
75	19,79	19,68	19,75	19,74	3,09	34,17
77	19,11	18,88	19,05	19,01	3,68	32,92
79	21,03	20,88	21,09	21,00	1,70	32,82

7. Anhang

81	18,29	20,07	19,98	20,03	2,68	32,08
83	21,17	21,10	21,06	21,11	1,85	33,31
85	19,20	17,68	12,32	16,40	6,37	34,11
87	19,27	19,25	19,30	19,27	3,72	31,83
89	21,24	21,11	21,22	21,19	1,49	32,47

<b>Nr.</b>	<b>R-cyccomp1</b>	<b>R-cyccomp2</b>	<b>R-cyccomp3</b>	<b>Mw R-cyccomp</b>
1	25,34	25,37	25,42	25,38
3	26,06	25,70	25,89	25,98
5	25,12	25,10	25,16	25,13
7	25,16	25,36	25,08	25,20
9	25,02	25,03	25,28	25,11
11	25,09	25,24	24,90	25,17
13	25,09	25,03	25,19	25,10
15	25,14	24,99	25,11	25,08
17	25,06	24,83	24,94	24,94
19	25,13	25,25	25,05	25,14
21	25,10	25,03	25,08	25,07
23	25,42	25,66	25,51	25,53
25	25,33	25,56	25,88	25,45
27	25,15	25,11	25,17	25,14
29	25,84	25,49	25,34	25,42
31	25,39	25,75	26,03	25,89
33	25,33	25,63	25,28	25,31
35	25,16	25,36	25,16	25,23
37	25,04	25,20	25,16	25,13
39	26,01	26,04	25,57	26,03
41	25,53	25,55	25,60	25,56
43	25,80	25,93	25,83	25,85
45	26,08	26,16	26,42	26,12
47	26,01	26,24	26,02	26,09
49	25,94	25,91	26,20	26,02
51	25,83	25,95	25,70	25,83
53	25,71	25,58	26,16	25,65
55	25,94	25,79	25,83	25,85
57	26,12	25,91	25,86	25,96
59	25,96	26,10	25,69	26,03
61	25,69	25,53	25,80	25,67
63	26,07	26,22	25,80	26,15
65	26,23	19,49	26,23	23,98



67	25,23	25,39	25,35	25,32
69	27,17	26,90	26,42	27,04
71	25,77	26,07	25,76	25,77
73	26,48	26,18	26,79	26,33
75	24,82	24,70	24,89	24,80
77	12,46	11,81	10,09	11,45
79	24,90	24,74	24,59	24,67
81	25,05	9,44	24,73	19,74
83	24,57	24,49	24,51	24,52
85	10,86	24,91	12,90	16,22
87	24,79	24,97	24,91	24,89
89	24,30	24,43	24,47	24,40

<b>Nr.</b>	<b>R-cycwild1</b>	<b>R-cycwild2</b>	<b>R-cycwild3</b>	<b>Mw R-cycwild</b>
1	21,90	21,86	21,90	21,89
3	20,90	20,75	20,74	20,80
5	21,51	21,55	21,34	21,47
7	21,54	21,72	21,46	21,57
9	22,42	22,35	22,44	22,40
11	21,66	21,37	20,89	21,52
13	25,09	24,97	25,19	25,08
15	22,28	22,19	22,35	22,27
17	24,64	24,62	24,60	24,62
19	22,29	22,29	22,37	22,32
21	21,84	21,76	21,60	21,73
23	21,32	14,29	21,30	21,31
25	20,47	20,28	20,25	20,33
27	21,54	21,37	21,33	21,41
29	20,99	21,14	21,39	21,07
31	20,59	20,49	20,44	20,51
33	22,13	21,83	22,18	22,16
35	21,24	21,25	21,34	21,28
37	24,45	24,49	24,62	24,52
39	21,81	21,62	21,96	21,89
41	22,04	22,10	22,21	22,12
43	21,73	21,50	21,80	21,68
45	21,59	21,38	21,85	21,49
47	23,58	23,55	23,38	23,50
49	21,38	19,50	21,46	21,42
51	21,02	21,34	18,58	20,31

53	22,06	22,01	22,14	22,07
55	23,21	22,46	23,03	23,12
57	21,15	21,37	21,36	21,37
59	20,77	21,39	21,24	21,32
61	22,23	21,87	22,18	22,21
63	21,67	21,71	22,08	21,69
65	11,25	11,76	8,69	10,57
67	23,62	23,72	23,66	23,67
69	10,59	7,88	11,29	9,92
71	22,57	22,36	22,48	22,47
73	10,08	12,21	7,82	10,04
75	9,03	10,2	10,15	10,18
77	9,78	11,01	10,24	10,34
79	31,16	13,2	Undetermined	22,18
81	9,87	10,45	10,74	10,60
83	21,84	21,93	22,05	21,94
85	20,69	20,71	8,96	20,70
87	17,63	20,24	20,15	20,20
89	21,19	21,26	21,34	21,26

<b>Nr.</b>	<b>R-comp-wild</b>	<b>R-StrdRNA wild</b>	<b><math>E^{-\Delta CT}</math> (E=2)</b>
1	3,49	22,85	0,51
3	5,18	22,85	0,24
5	3,66	22,85	0,38
7	3,63	22,85	0,41
9	2,71	22,85	0,73
11	3,65	22,85	0,40
13	0,02	22,85	4,71
15	2,81	22,85	0,67
17	0,32	22,85	3,41
19	2,83	22,85	0,69
21	3,34	22,85	0,46
23	4,22	22,85	0,34
25	5,11	22,85	0,17
27	3,73	22,85	0,37
29	4,35	22,85	0,29
31	5,38	22,85	0,20
33	3,15	22,85	0,62
35	3,95	22,85	0,34
37	0,61	22,85	3,19

39	4,14	22,85	0,51
41	3,44	22,85	0,60
43	4,18	22,85	0,44
45	4,64	22,85	0,39
47	2,59	22,85	1,57
49	4,60	22,85	0,37
51	5,51	22,85	0,17
53	3,58	22,85	0,58
55	2,73	22,85	1,21
57	4,60	22,85	0,36
59	4,72	22,85	0,35
61	3,47	22,85	0,64
63	4,46	22,85	0,45
65	13,42	22,85	0,00
67	1,66	22,85	1,76
69	17,12	22,85	0,00
71	3,30	22,85	0,77
73	16,29	22,85	0,00
75	14,63	22,85	0,00
77	1,11	22,85	0,00
79	2,49	22,85	0,63
81	9,15	22,85	0,00
83	2,58	22,85	0,53
85	-4,48	22,85	0,23
87	4,70	22,85	0,16
89	3,14	22,85	0,33

<b>Nr.</b>	<b>R-GAPDH 1</b>	<b>R-GAPDH 2</b>	<b>R-GAPDH 3</b>	<b>Mw R-GAPDH</b>
1	Auto	Auto	Auto	20,05
3	Auto	Auto	Auto	19,06
5	Auto	Auto	Auto	23,07
7	Auto	Auto	Auto	19,34
9	Auto	Auto	Auto	20,40
11	Auto	Auto	Auto	20,03
13	24,25	24,14	24,23	24,21
15	20,27	20,27	20,24	20,26
17	23,61	23,45	21,01	23,53
19	18,07	17,96	18,18	18,07
21	21,01	19,06	21,07	21,04
23	18,73	16,29	17,14	17,39

25	16,13	16,51	16,02	16,08
27	17,35	17,38	18,45	17,37
29	19,49	19,69	19,66	19,61
31	18,77	18,68	18,94	18,80
33	21,36	21,57	30,29	21,47
35	19,74	19,67	19,64	19,68
37	24,19	24,13	24,17	24,16
39	19,48	19,62	19,64	19,58
41	19,83	20,03	20,04	19,97
43	19,83	19,92	19,83	19,86
45	19,57	19,65	19,57	19,60
47	21,83	22,04	22,11	21,99
49	19,44	19,45	19,42	19,44
51	19,29	19,24	19,32	19,28
53	19,88	19,89	19,97	19,91
55	20,62	20,64	20,62	20,63
57	19,04	19,04	18,94	19,01
59	19,00	18,94	18,87	18,94
61	20,34	20,30	20,25	20,30
63	19,02	19,13	19,13	19,09
65	18,93	18,85	18,59	18,89
67	23,73	23,75	23,67	23,72
69	18,96	18,93	18,81	18,90
71	21,98	22,00	22,02	22,00
73	18,58	18,59	18,59	18,59
75	18,90	19,09	18,87	18,95
77	18,64	18,69	18,56	18,63
79	20,89	24,06	20,95	20,92
81	19,50	19,32	Undetermined	19,41
83	20,99	21,13	Undetermined	21,06
85	18,89	18,55	Undetermined	18,72
87	19,06	19,46	Undetermined	19,26
89	21,32	21,34	Undetermined	21,33

Nr.	StrdRNA R-GAPDH	Ratio R-GAPDH
1	18,56	2,81
3	18,56	1,41
5	18,56	22,78
7	18,56	1,72
9	18,56	3,58

11	18,56	2,77
13	17,27	122,50
15	17,27	7,94
17	17,27	76,64
19	17,27	1,74
21	17,27	13,64
23	17,27	1,08
25	17,27	0,44
27	17,27	1,07
29	18,97	1,56
31	18,97	0,89
33	18,97	5,64
35	18,97	1,64
37	18,97	36,59
39	18,97	1,53
41	18,97	2,00
43	18,97	1,85
45	18,97	1,54
47	18,97	8,13
49	18,97	1,38
51	18,97	1,24
53	18,97	1,92
55	18,97	3,15
57	18,97	1,03
59	18,97	0,98
61	18,97	2,51
63	18,97	1,09
65	18,97	0,95
67	18,97	26,85
69	18,97	0,95
71	18,97	8,17
73	18,97	0,77
75	19,14	0,88
77	19,14	0,70
79	19,14	3,43
81	19,14	1,21
83	19,14	3,78
85	19,14	0,75
87	19,14	1,09
89	19,14	4,56

<b>Nr.</b>	<b>R-ACTB 1</b>	<b>R-ACTB 2</b>	<b>R-ACTB 3</b>	<b>Mw R-ACTB</b>
1	Auto	Auto	Auto	20,19
3	Auto	Auto	Auto	18,94
5	Auto	Auto	Auto	20,22
7	Auto	Auto	Auto	20,15
9	Auto	Auto	Auto	20,94
11	Auto	Auto	Auto	19,62
13	24,40	24,44	24,36	24,40
15	20,39	20,42	20,44	20,42
17	24,08	24,10	24,00	24,06
19	19,70	19,64	19,69	19,68
21	21,06	21,12	21,10	21,09
23	18,75	18,87	18,65	18,76
25	18,49	18,57	18,54	18,53
27	20,88	21,26	20,78	20,83
29	19,23	19,37	19,35	19,32
31	19,47	19,63	19,91	19,55
33	20,64	25,99	28,68	25,10
35	19,88	19,92	20,00	19,93
37	24,15	24,22	24,09	24,15
39	19,90	20,09	20,04	20,01
41	20,19	20,41	20,85	20,30
43	20,31	20,28	20,31	20,30
45	19,92	20,05	20,05	20,01
47	22,65	22,70	22,89	22,75
49	19,57	19,62	19,84	19,68
51	19,69	19,63	19,57	19,63
53	19,97	20,08	20,13	20,06
55	21,51	21,48	21,50	21,50
57	19,41	19,61	19,45	19,49
59	19,03	19,10	19,12	19,08
61	21,37	21,49	21,33	21,40
63	19,62	19,70	19,70	19,67
65	19,05	19,06	19,13	19,08
67	23,98	24,04	23,99	24,00
69	18,64	18,62	18,63	18,63
71	21,66	21,83	21,89	21,86
73	18,20	18,22	18,40	18,27
75	19,21	19,37	Undetermined	19,29
77	18,56	19,18	Undetermined	18,87
79	21,08	Undetermined	Undetermined	21,08

81	19,34	19,51	Undetermined	19,43
83	20,99	21,36	Undetermined	21,18
85	18,18	18,37	Undetermined	18,28
87	18,50	Undetermined	Undetermined	18,50
89	21,35	21,40	Undetermined	21,38

<b>Nr.</b>	<b>Strd RNA R-ACTB</b>	<b>Ratio R-ACTB</b>
1	18,08	4,32
3	18,08	1,82
5	18,08	4,41
7	18,08	4,20
9	18,08	7,26
11	18,08	2,91
13	17,66	106,89
15	17,66	6,76
17	17,66	84,45
19	17,66	4,05
21	17,66	10,80
23	17,66	2,14
25	17,66	1,83
27	17,66	9,00
29	18,66	1,58
31	18,66	1,85
33	18,66	87,02
35	18,66	2,42
37	18,66	45,05
39	18,66	2,55
41	18,66	3,12
43	18,66	3,12
45	18,66	2,54
47	18,66	16,99
49	18,66	2,02
51	18,66	1,96
53	18,66	2,64
55	18,66	7,14
57	18,66	1,78
59	18,66	1,34
61	18,66	6,67
63	18,66	2,02
65	18,66	1,34

67	18,66	40,60
69	18,66	0,98
71	18,66	9,19
73	18,66	0,76
75	18,52	1,71
77	18,52	1,27
79	18,52	5,90
81	18,52	1,87
83	18,52	6,30
85	18,52	0,84
87	18,52	0,99
89	18,52	7,24

<b>Nr.</b>	<b>A-GAPDH 1</b>	<b>A-GAPDH 2</b>	<b>A-GAPDH 3</b>	<b>Mw A-GAPDH</b>
1	20,45	20,55	20,34	20,45
3	19,59	19,51	19,08	19,55
5	20,46	20,55	20,44	20,48
7	20,62	20,46	20,43	20,50
9	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
11	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
13	26,49	26,50	26,64	26,54
15	21,96	22,08	22,13	22,06
17	26,28	31,31	31,24	31,28
19	21,64	21,61	21,74	21,66
21	23,95	23,98	24,04	23,99
23	20,62	20,75	20,79	20,72
25	20,21	20,36	20,38	20,32
27	22,29	22,28	22,36	22,31
29	20,67	20,82	20,82	20,77
31	19,83	19,98	19,96	19,92
33	21,94	22,06	21,99	22,00
35	21,00	20,94	20,92	20,95
37	26,34	26,38	26,45	26,39
39	21,07	21,18	21,08	21,11
41	21,33	21,39	21,32	21,35
43	21,21	21,29	21,29	21,26
45	21,03	21,18	21,13	21,11
47	24,14	24,02	23,97	24,04
49	20,37	20,34	20,33	20,35
51	20,71	20,73	20,57	20,67



53	21,16	21,15	21,14	21,15
55	23,04	22,98	23,06	23,03
57	20,20	20,27	20,28	20,25
59	20,16	20,15	20,12	20,14
61	22,46	22,63	22,40	22,50
63	20,36	20,32	20,15	20,28
65	19,99	20,20	19,90	20,03
67	26,28	26,31	26,08	26,22
69	19,77	19,60	19,73	19,70
71	23,92	24,62	27,36	25,30
73	19,51	19,73	19,58	19,61
75	20,03	19,90	19,77	19,90
77	19,52	19,62	19,58	19,57
79	22,17	22,37	22,06	22,12
81	20,54	20,59	20,48	20,54
83	22,67	22,80	22,64	22,70
85	19,32	19,24	19,38	19,31
87	20,20	20,20	20,14	20,18
89	23,03	22,92	22,92	22,96

<b>Nr.</b>	<b>StrdRNA A-GAPDH</b>	<b>Ratio A-GAPDH</b>
1	18,45	3,99
3	18,45	2,14
5	18,45	4,09
7	18,45	4,15
9	18,45	0,00
11	18,45	0,00
13	18,52	260,17
15	18,52	11,60
17	18,52	6912,54
19	18,52	8,84
21	18,52	44,32
23	18,52	4,59
25	18,52	3,47
27	18,52	13,83
29	18,52	4,76
31	18,52	2,65
33	18,52	11,13
35	18,52	5,40
37	18,52	233,94

39	18,52	6,02
41	18,52	7,09
43	18,52	6,70
45	18,52	6,03
47	18,52	45,99
49	18,52	3,55
51	18,52	4,44
53	18,52	6,19
55	18,52	22,73
57	18,52	3,32
59	18,52	3,08
61	18,52	15,74
63	18,52	3,38
65	18,52	2,85
67	18,67	187,84
69	18,67	2,04
71	18,67	99,04
73	18,67	1,91
75	18,67	2,35
77	18,67	1,87
79	18,67	10,89
81	18,67	3,65
83	18,67	16,37
85	18,67	1,56
87	18,67	2,85
89	18,67	19,52

<b>Nr.</b>	<b>A-ACTB 1</b>	<b>A-ACTB 2</b>	<b>A-ACTB 3</b>	<b>Mw A-ACTB</b>
1	20,26	20,21	20,46	20,31
3	18,87	19,01	18,77	18,88
5	20,44	20,62	20,70	20,59
7	20,39	20,52	20,35	20,42
9	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
11	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
13	27,37	27,54	27,48	27,46
15	22,30	22,44	22,58	22,44
17	26,99	29,11	38,89	31,66
19	21,12	21,21	21,14	21,16
21	23,62	23,65	23,65	23,64
23	20,17	20,30	20,39	20,29

25	19,90	20,11	20,23	20,17
27	22,61	22,51	22,59	22,57
29	20,32	20,28	20,23	20,28
31	19,91	20,10	20,07	20,03
33	21,34	21,52	21,77	21,43
35	20,71	20,77	20,62	20,70
37	26,01	25,96	26,08	26,02
39	21,07	21,14	21,15	21,12
41	21,37	21,39	21,37	21,38
43	21,14	21,20	21,25	21,20
45	21,00	21,05	21,00	21,02
47	23,77	23,90	23,89	23,85
49	20,07	19,96	20,13	20,05
51	20,55	20,48	20,45	20,49
53	21,10	21,10	21,00	21,07
55	23,15	23,16	23,17	23,16
57	20,11	20,06	20,21	20,13
59	19,67	19,65	19,67	19,66
61	23,02	22,92	23,04	23,03
63	20,56	20,55	20,60	20,57
65	19,54	19,73	19,64	19,64
67	25,94	26,22	26,23	26,13
69	19,43	19,58	19,47	19,49
71	23,38	23,46	23,63	23,49
73	19,12	18,89	19,02	19,01
75	19,84	19,76	19,65	19,75
77	19,11	19,14	19,01	19,09
79	21,90	22,18	22,16	22,08
81	20,32	20,34	20,13	20,26
83	22,68	22,48	22,41	22,52
85	18,92	18,78	18,87	18,86
87	19,75	19,51	19,73	19,66
89	22,65	22,62	22,65	22,64

Nr.	Strd RNA A-ACTB	Ratio A-ACTB
1	17,90	5,31
3	17,90	1,98
5	17,90	6,44
7	17,90	5,74
9	17,90	0,00

11	17,90	0,00
13	18,33	561,57
15	18,33	17,27
17	18,33	10321,27
19	18,33	7,09
21	18,33	39,67
23	18,33	3,88
25	18,33	3,58
27	18,33	18,90
29	18,33	3,85
31	18,33	3,24
33	18,33	8,57
35	18,33	5,17
37	18,33	206,02
39	18,33	6,92
41	18,33	8,26
43	18,33	7,29
45	18,33	6,44
47	18,33	45,99
49	18,33	3,30
51	18,33	4,48
53	18,33	6,67
55	18,33	28,44
57	18,33	3,47
59	18,33	2,52
61	18,33	25,99
63	18,33	4,72
65	18,33	2,47
67	18,35	219,79
69	18,35	2,21
71	18,35	35,26
73	18,35	1,58
75	18,35	2,64
77	18,35	1,67
79	18,35	13,27
81	18,35	3,77
83	18,35	18,04
85	18,35	1,42
87	18,35	2,49
89	18,35	19,56

Nr.	R-GAPDH2 1	R-GAPDH2 2	R-GAPDH2 3	Mw R-GAPDH2
1	22,30	22,08	22,61	22,19
3	20,37	21,13	21,93	21,14
5	21,05	21,30	26,95	21,18
7	21,24	21,12	21,14	21,17
9	23,08	22,96	22,96	23,00
11	20,59	20,62	20,82	20,68
13	26,49	26,78	26,73	26,67
15	22,37	22,51	22,42	22,43
17	25,39	25,29	25,22	25,30
19	21,69	21,70	21,39	21,70
21	23,05	23,20	23,02	23,09
23	20,04	20,06	20,04	20,05
25	19,70	19,94	19,88	19,84
27	21,75	21,51	21,83	21,79
29	20,84	20,73	20,75	20,77
31	19,97	20,03	19,90	19,97
33	21,45	21,44	21,43	21,44
35	20,54	20,49	20,56	20,53
37	26,22	26,27	26,19	26,23
39	21,30	21,23	21,20	21,24
41	21,32	21,13	21,12	21,19
43	21,78	21,74	21,90	21,81
45	21,13	21,10	21,13	21,12
47	24,99	24,63	24,83	24,91
49	21,22	21,24	21,19	21,22
51	20,43	20,43	20,62	20,49
53	21,90	21,79	22,02	21,90
55	23,22	23,26	23,31	23,26
57	20,08	20,13	21,17	20,11
59	20,16	20,18	23,49	20,17
61	22,85	22,76	22,78	22,80
63	20,47	20,45	20,29	20,40
65	19,59	19,70	19,86	19,72
67	26,29	26,59	27,55	26,44
69	19,34	19,31	19,40	19,35
71	23,34	23,42	23,33	23,36
73	18,61	18,74	18,93	18,68
75	19,86	19,97	19,71	19,85
77	19,96	19,70	19,75	19,80
79	22,07	22,22	22,14	22,14

81	20,08	20,18	20,08	20,11
83	22,19	22,22	22,65	22,21
85	18,64	18,69	18,67	18,67
87	19,31	19,19	19,25	19,25
89	21,93	21,80	22,02	21,92

<b>Nr.</b>	<b>StrdRNA R-GAPDH2</b>	<b>Ratio R-GAPDH2</b>
1	19,94	4,76
3	19,94	2,30
5	19,94	2,35
7	19,94	2,34
9	19,94	8,34
11	19,94	1,67
13	19,94	105,91
15	19,94	5,63
17	19,94	41,07
19	19,94	3,38
21	19,94	8,88
23	19,94	1,08
25	19,94	0,93
27	19,94	3,61
29	19,94	1,78
31	19,94	1,02
33	19,94	2,83
35	19,94	1,51
37	19,94	78,07
39	19,94	2,47
41	19,94	2,38
43	19,94	3,65
45	19,94	2,27
47	19,94	31,34
49	19,94	2,42
51	19,94	1,47
53	19,94	3,90
55	19,88	10,43
57	19,88	1,17
59	19,88	1,22
61	19,88	7,55
63	19,88	1,44
65	19,88	0,89

67	19,88	94,35
69	19,88	0,69
71	19,88	11,18
73	19,88	0,43
75	19,88	0,98
77	19,88	0,95
79	19,88	4,80
81	19,88	1,18
83	19,88	5,01
85	19,88	0,43
87	19,88	0,65
89	19,88	4,10

<b>Nr.</b>	<b>R-FASN1 1</b>	<b>R-FASN1 2</b>	<b>R-FASN1 3</b>	<b>Mw R-FASN1</b>
1	21,80	22,02	21,92	21,91
3	20,90	20,91	21,36	20,91
5	21,90	18,46	20,22	20,19
7	21,63	21,33	21,25	21,29
9	22,59	22,50	22,33	22,47
11	21,09	21,03	21,05	21,06
13	28,38	28,48	28,76	28,43
15	22,63	22,70	22,61	22,65
17	27,36	27,39	27,15	27,30
19	21,33	21,36	21,43	21,37
21	23,24	23,39	23,73	23,32
23	21,22	21,05	21,01	21,09
25	20,68	20,81	20,63	20,71
27	22,68	22,44	22,57	22,56
29	21,08	21,12	21,08	21,09
31	20,20	20,32	20,22	20,25
33	21,66	21,44	21,58	21,56
35	20,53	20,52	20,61	20,55
37	25,21	25,28	25,36	25,28
39	22,22	22,18	22,03	22,14
41	21,87	21,73	21,80	21,80
43	22,24	22,32	22,44	22,33
45	21,18	21,13	21,40	21,24
47	25,03	25,07	24,92	25,01
49	21,29	21,45	21,55	21,43
51	20,66	20,48	20,70	20,61

53	21,73	22,02	22,24	22,13
55	22,28	22,52	22,26	22,35
57	21,06	21,99	21,40	21,48
59	21,86	23,40	27,21	24,16
61	23,15	23,10	23,02	23,09
63	21,28	21,46	21,47	21,40
65	20,48	20,50	20,47	20,48
67	25,23	25,37	26,57	25,30
69	20,06	20,16	20,10	20,11
71	22,48	22,47	22,38	22,44
73	19,42	19,25	19,29	19,27
75	20,38	20,33	20,70	20,36
77	20,32	20,42	20,42	20,42
79	22,95	22,66	22,56	22,61
81	20,63	20,46	20,61	20,57
83	22,23	22,17	22,40	22,27
85	19,64	19,83	19,65	19,71
87	20,33	20,38	20,31	20,34
89	22,47	22,46	22,14	22,47

<b>Nr.</b>	<b>StrdRNA R-FASN1</b>	<b>Ratio R-FASN1</b>
1	20,40	2,85
3	20,40	1,42
5	20,40	0,87
7	20,40	1,85
9	20,40	4,21
11	20,40	1,58
13	20,40	261,38
15	20,40	4,75
17	20,40	119,43
19	20,40	1,96
21	20,40	7,54
23	20,40	1,62
25	20,40	1,24
27	20,40	4,48
29	20,40	1,62
31	20,40	0,90
33	20,40	2,23
35	20,40	1,11
37	20,40	29,51



39	20,40	3,35
41	20,40	2,64
43	20,40	3,82
45	20,40	1,79
47	20,40	24,36
49	20,40	2,04
51	20,40	1,16
53	20,40	3,32
55	20,12	4,70
57	20,12	2,57
59	20,12	16,41
61	20,12	7,84
63	20,12	2,43
65	20,12	1,29
67	20,12	36,25
69	20,12	0,99
71	20,12	5,00
73	20,12	0,55
75	20,12	1,18
77	20,12	1,23
79	20,12	5,62
81	20,12	1,36
83	20,12	4,43
85	20,12	0,75
87	20,12	1,16
89	20,12	5,08

<b>Nr.</b>	<b>R-FASN4 1</b>	<b>R-FASN4 2</b>	<b>R-FASN4 3</b>	<b>Mw R-FASN4</b>
1	20,23	20,21	20,29	20,24
3	18,88	18,92	18,88	18,89
5	21,21	18,53	21,28	21,25
7	20,18	20,26	20,20	20,21
9	21,35	21,44	21,37	21,39
11	20,05	19,99	20,03	20,02
13	26,48	26,91	25,66	26,35
15	21,28	21,27	21,19	21,25
17	25,58	25,61	25,49	25,56
19	20,29	20,30	20,43	20,34
21	22,79	22,68	22,55	22,67
23	19,98	20,05	19,86	19,96

25	19,68	19,82	19,73	19,74
27	21,24	21,16	21,26	21,22
29	19,83	19,79	19,74	19,79
31	19,30	19,40	19,26	19,32
33	20,38	20,28	20,33	20,33
35	19,70	19,75	19,84	19,76
37	23,47	23,62	23,50	23,53
39	20,53	20,55	20,57	20,55
41	20,53	20,51	20,42	20,49
43	23,43	20,67	21,00	21,70
45	20,25	20,22	20,16	20,21
47	23,33	23,45	23,33	23,37
49	20,04	19,94	19,97	19,98
51	19,71	19,67	19,72	19,70
53	20,31	20,44	20,56	20,44
55	21,12	21,06	21,05	21,08
57	19,51	19,55	19,46	19,51
59	19,51	21,17	15,30	18,66
61	22,32	22,28	22,26	22,29
63	21,49	20,36	20,31	20,34
65	19,34	19,51	19,52	19,46
67	24,02	24,22	23,91	23,97
69	19,24	19,32	19,20	19,25
71	21,85	21,63	21,56	21,68
73	18,58	18,71	18,71	18,67
75	19,28	19,38	19,23	19,30
77	19,20	19,15	19,15	19,17
79	21,72	21,63	21,60	21,65
81	19,50	19,39	19,48	19,46
83	21,17	21,22	21,05	21,15
85	19,04	19,02	18,90	18,99
87	19,49	19,41	19,40	19,43
89	21,68	21,81	21,81	21,77

Nr.	StrdRNA R-FASN4	Ratio R-FASN4
1	18,83	2,66
3	18,83	1,04
5	18,83	5,33
7	18,83	2,61
9	18,83	5,88

11	18,83	2,29
13	18,83	183,55
15	18,83	5,34
17	18,83	106,15
19	18,83	2,85
21	18,83	14,35
23	18,83	2,19
25	18,83	1,88
27	18,83	5,24
29	18,83	1,94
31	18,83	1,40
33	18,83	2,83
35	18,83	1,91
37	18,83	25,99
39	18,83	3,29
41	18,83	3,15
43	18,83	7,31
45	18,83	2,60
47	18,83	23,26
49	18,83	2,22
51	18,83	1,83
53	18,83	3,05
55	18,85	4,68
57	18,85	1,58
59	18,85	0,88
61	18,85	10,83
63	18,85	2,80
65	18,85	1,52
67	18,85	34,66
69	18,85	1,32
71	18,85	7,11
73	18,85	0,88
75	18,85	1,36
77	18,85	1,25
79	18,85	6,96
81	18,85	1,52
83	18,85	4,91
85	18,85	1,10
87	18,85	1,50
89	18,85	7,55

<b>Nr.</b>	<b>A-GAPDH2 1</b>	<b>A-GAPDH2 2</b>	<b>A-GAPDH2 3</b>	<b>Mw A-GAPDH2</b>
1	23,08	24,24	24,83	24,05
3	24,30	25,09	26,12	25,17
5	25,13	24,61	21,10	23,61
7	21,52	20,39	20,23	20,31
9	22,21	21,86	21,96	21,91
11	19,85	19,74	20,05	19,80
13	26,36	26,95	35,18	29,50
15	23,11	21,56	21,64	21,60
17	25,13	25,15	25,08	25,12
19	20,16	20,22	20,47	20,19
21	22,98	23,30	29,84	25,37
23	20,63	19,58	19,20	19,80
25	18,84	18,73	18,68	18,75
27	21,00	20,89	21,24	20,95
29	20,00	20,15	26,57	20,08
31	20,09	19,21	19,01	19,11
33	20,55	20,42	20,39	20,45
35	19,31	19,24	19,34	19,30
37	26,53	26,89	30,82	28,08
39	21,09	20,45	20,23	20,34
41	20,58	20,50	20,30	20,46
43	20,64	20,81	20,84	20,76
45	19,89	19,81	24,34	19,85
47	24,19	24,12	23,76	24,16
49	19,21	19,20	19,19	19,20
51	19,40	19,44	19,39	19,41
53	20,26	20,56	24,92	20,41
55	24,33	24,12	25,19	24,23
57	23,89	24,06	21,82	23,98
59	29,15	29,60	35,29	31,35
61	23,85	23,15	23,18	23,17
63	19,33	19,40	19,27	19,33
65	18,21	18,28	18,30	18,26
67	25,42	25,92	29,62	26,99
69	18,52	17,69	17,86	17,78
71	22,31	22,27	22,08	22,22
73	17,04	17,05	17,13	17,07
75	18,15	18,27	23,94	18,21
77	18,28	17,70	17,48	17,59
79	20,48	20,38	20,62	20,49

81	18,33	18,26	18,31	18,30
83	21,40	21,37	25,59	21,39
85	18,29	17,89	17,55	17,91
87	17,93	17,97	18,01	17,97
89	21,05	21,11	21,21	21,12

<b>Nr.</b>	<b>StrdRNA A-GAPDH2</b>	<b>Ratio A-GAPDH2</b>
1	22,09	3,89
3	22,09	8,46
5	22,09	2,87
7	22,09	0,29
9	22,09	0,88
11	22,09	0,20
13	22,09	169,68
15	22,09	0,71
17	22,09	8,17
19	22,09	0,27
21	22,09	9,74
23	22,09	0,20
25	22,09	0,10
27	22,09	0,45
29	22,09	0,25
31	22,09	0,13
33	22,09	0,32
35	22,09	0,14
37	22,09	63,56
39	22,09	0,30
41	22,09	0,32
43	22,09	0,40
45	22,09	0,21
47	22,09	4,18
49	22,09	0,13
51	22,09	0,16
53	22,09	0,31
55	20,95	9,68
57	20,95	8,14
59	20,95	1348,06
61	20,95	4,64
63	20,95	0,33
65	20,95	0,16

67	20,95	65,65
69	20,95	0,11
71	20,95	2,41
73	20,95	0,07
75	20,95	0,15
77	20,95	0,10
79	20,95	0,73
81	20,95	0,16
83	20,95	1,35
85	20,95	0,12
87	20,95	0,13
89	20,95	1,13

<b>Nr.</b>	<b>A-FASN1 1</b>	<b>A-FASN1 2</b>	<b>A-FASN1 3</b>	<b>Mw A-FASN1</b>
1	22,33	22,38	22,51	22,41
3	21,50	21,75	22,55	21,63
5	24,69	28,88	29,34	27,64
7	22,36	22,18	22,16	22,23
9	23,49	23,61	23,51	23,54
11	21,47	21,47	21,63	21,52
13	31,02	31,83	34,19	32,35
15	23,79	23,67	23,85	23,77
17	28,75	28,62	28,87	28,75
19	21,40	21,50	21,62	21,51
21	25,09	25,33	26,04	25,21
23	21,67	21,69	21,57	21,64
25	21,17	21,15	21,24	21,19
27	24,43	24,47	24,52	24,47
29	22,01	22,00	23,22	22,01
31	21,29	21,18	21,11	21,19
33	22,85	22,68	22,92	22,82
35	21,79	21,94	21,98	21,90
37	27,08	27,33	28,24	27,21
39	23,15	23,14	22,93	23,07
41	22,93	23,01	22,84	22,93
43	23,14	23,18	23,23	23,18
45	22,13	22,17	22,97	22,15
47	26,02	25,95	25,87	25,95
49	21,42	21,41	21,23	21,35
51	21,34	21,31	21,73	21,33

53	22,40	22,31	23,04	22,36
55	24,02	24,07	24,04	24,04
57	21,40	21,53	21,96	21,47
59	20,60	23,60	29,34	24,51
61	24,27	24,15	24,09	24,17
63	22,05	22,12	22,03	22,07
65	20,63	20,74	20,70	20,69
67	27,21	27,63	28,57	27,80
69	20,39	20,41	20,41	20,40
71	24,13	24,31	24,14	24,19
73	19,62	19,60	19,70	19,64
75	20,36	20,64	21,69	20,50
77	19,93	19,95	19,91	19,93
79	23,02	23,07	23,10	23,06
81	20,58	20,55	20,58	20,57
83	23,20	23,36	23,90	23,28
85	19,50	19,34	19,32	19,39
87	20,15	20,20	20,29	20,21
89	23,45	23,35	23,46	23,42

<b>Nr.</b>	<b>StrdRNA A-FASN1</b>	<b>Ratio A-FASN1</b>
1	20,60	3,50
3	20,60	2,03
5	20,60	131,29
7	20,60	3,10
9	20,60	7,66
11	20,60	1,90
13	20,60	3436,36
15	20,60	9,00
17	20,60	283,39
19	20,60	1,87
21	20,60	24,42
23	20,60	2,06
25	20,60	1,50
27	20,60	14,66
29	20,60	2,65
31	20,60	1,51
33	20,60	4,65
35	20,60	2,47
37	20,60	97,34

39	20,60	5,55
41	20,60	5,02
43	20,60	5,99
45	20,60	2,93
47	20,60	40,69
49	20,60	1,69
51	20,60	1,65
53	20,60	3,38
55	20,24	13,96
57	20,24	2,34
59	20,24	19,34
61	20,24	15,24
63	20,24	3,55
65	20,24	1,37
67	20,24	189,14
69	20,24	1,12
71	20,24	15,49
73	20,24	0,66
75	20,24	1,20
77	20,24	0,81
79	20,24	7,08
81	20,24	1,26
83	20,24	8,22
85	20,24	0,55
87	20,24	0,98
89	20,24	9,06

<b>Nr.</b>	<b>A-FASN4 1</b>	<b>A-FASN4 2</b>	<b>A-FASN4 3</b>	<b>Mw A-FASN4</b>
1	21,37	21,36	21,34	21,36
3	19,62	19,63	19,76	19,67
5	21,39	21,15	23,70	21,27
7	21,68	21,57	21,46	21,57
9	23,29	23,43	23,19	23,30
11	20,88	20,84	20,96	20,89
13	29,40	30,08	29,78	29,93
15	22,67	22,77	22,72	22,72
17	27,65	28,06	27,89	27,98
19	20,86	20,92	21,05	20,94
21	25,57	25,32	25,64	25,61
23	21,07	21,06	21,09	21,07



25	21,00	20,85	20,76	20,87
27	23,24	23,16	23,33	23,24
29	21,39	21,39	21,54	21,44
31	20,56	20,67	20,51	20,58
33	22,20	22,66	22,15	22,18
35	21,05	21,08	21,19	21,11
37	26,18	26,37	26,91	26,28
39	22,13	22,19	22,08	22,13
41	22,18	22,02	22,12	22,11
43	22,18	22,16	22,22	22,19
45	21,84	21,55	21,66	21,68
47	25,23	25,52	25,30	25,35
49	20,50	20,58	20,47	20,52
51	21,07	21,16	21,12	21,12
53	22,85	21,68	21,59	21,64
55	23,49	23,57	23,59	23,55
57	20,36	20,50	21,25	20,43
59	21,09	21,60	24,04	22,24
61	24,04	24,06	23,91	24,00
63	21,54	21,47	21,41	21,47
65	20,12	20,12	20,10	20,11
67	26,71	27,27	25,94	26,64
69	19,76	19,81	19,76	19,78
71	23,90	24,06	23,96	23,97
73	19,11	19,07	19,26	19,15
75	20,10	20,10	20,14	20,11
77	19,53	19,44	19,38	19,45
79	23,23	23,22	23,11	23,19
81	20,39	20,27	20,40	20,35
83	23,26	23,18	23,17	23,20
85	19,24	19,26	19,14	19,21
87	19,97	19,89	20,00	19,95
89	23,18	23,29	23,27	23,25

Nr.	StrdRNA A-FASN4	Ratio A-FASN4
1	19,46	3,72
3	19,46	1,16
5	19,46	3,51
7	19,46	4,32
9	19,46	14,35

11	19,46	2,70
13	19,46	1418,35
15	19,46	9,58
17	19,46	365,82
19	19,46	2,80
21	19,46	70,77
23	19,46	3,06
25	19,46	2,66
27	19,46	13,77
29	19,46	3,94
31	19,46	2,17
33	19,46	6,57
35	19,46	3,13
37	19,46	112,60
39	19,46	6,38
41	19,46	6,26
43	19,46	6,62
45	19,46	4,67
47	19,46	59,30
49	19,46	2,08
51	19,46	3,15
53	19,46	4,52
55	19,53	16,22
57	19,53	1,87
59	19,53	6,56
61	19,53	22,21
63	19,53	3,85
65	19,53	1,50
67	19,53	138,14
69	19,53	1,19
71	19,53	21,76
73	19,53	0,77
75	19,53	1,50
77	19,53	0,95
79	19,53	12,61
81	19,53	1,77
83	19,53	12,76
85	19,53	0,80
87	19,53	1,34
89	19,53	13,15

**7.4. Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Anker Priming
A	Extinktion
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
ACTB	Beta Actin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
c	Konzentration
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
comp.	competitiv
C <sub>T</sub>	Cycle of threshold
CTP	Cytidintriphosphat
Cyc	Cyclophilin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Effizienz
FASN	Fettsäuresynthetase
g	Gramm
g	Zentrifugalbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
k	Konzentrationsfaktor
LLZ	Leichenliegezeit
log	Logarithmus
M	Masse

m	Steigung
min	Minute
mRNA	messenger RNA
Mw	Mittelwert
n	Anzahl
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Hydroeen
ng	Nanogramm
nmg	Milligramm
p	Probe
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Quotient der Extinktionen
r	Korrelationskoeffizient
R	Random Priming
R	Ratio
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
S	Standard
S	Sedimentationsgeschwindigkeit
s.o.	siehe oben
snoRNAs	small nucleolar RNAs
snRNAs	small nuclear RNAs
sog.	sogenannt
t	Zeit
TF	Transkriptionsfaktoren
tRNA	transfer RNA
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
V	Volumen
VNTRs	variable number of tandem repeats
z.B.	zum Beispiel

## **DANKSAGUNG**

Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. D. Patzelt für die freundliche Übernahme der Arbeit sowie für die Begleitung und Beratung bei der Ausarbeitung bedanken. Ohne seine überaus große Hilfsbereitschaft und Unterstützung wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Bauer für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung. Die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit, die ich hier erfahren durfte, sind in außerordentlicher Weise hervorzuheben.

Ebenso danke ich dem gesamten Team des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg für die freundliche Aufnahme, das sehr gute und angenehme Arbeitsklima und die ständige Bereitschaft zur Hilfestellung und Beratung.

Herrn Dr. rer. nat. U. Mäder, dem Leiter des Tumorregisters des Tumorzentrums der Universität Würzburg, danke ich für die Durchsicht und Überprüfung der statistischen Auswertung.

Bei Problemen bezüglich graphischer Darstellung und Textverarbeitung konnte ich stets auf die kompetente Hilfe von meiner Familie und Herrn Andreas Rumm zählen. Auch hierfür ein herzliches Dankeschön.

## **LEBENS LAUF**

Name: Christina Barbara Walter  
Geburtsdatum: 19.06.1982  
Geburtsort: Künzelsau  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1988-1992 Grund- und Hauptschule Ingelfingen  
1992-2001 Ganerben-Gymnasium Künzelsau  
mit Abschluss Abitur

### **Studium**

1999-2001 Kirchenmusik  
an der Kirchenmusikhochschule Rottenburg  
mit Abschluss C-Prüfung  
2001-2007 Humanmedizin  
an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
August 2003 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
November 2007 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Ärztliche Tätigkeit**

seit Dezember 2007 Assistenzärztin  
an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen

Weldingsfelden, Januar 2008